



ETSIA

Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Agronómica



ESCUELA
INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

WiA:24



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Libro de actas del 13^º Workshop en Investigación Agroalimentaria para jóvenes investigadores



Libro de actas del 13^o
Workshop en Investigación
Agroalimentaria para
jóvenes investigadores



Agradecimientos

El Comité Organizador agradece a la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica -ETSIA- y al Instituto de Biotecnología Vegetal -IBV- de la Universidad Politécnica de Cartagena -UPCT- su ayuda para hacer posible este evento. También se agradece la financiación recibida de la Escuela Internacional de Doctorado de la UPCT.

©2024 Programa de Doctorado en TAIDA
©2024, Universidad Politécnica de Cartagena

Ediciones UPCT
Plaza del Hospital,1
30202 Cartagena
968325908
ediciones@upct.es

ISBN: 978-84-17853-91-4

Créditos fotos de portada: Francisco Artés Hernández y Manuel Tornel Martínez.

Comité Científico y Organizador / Editores Técnicos

Dr. Francisco Artés Hernández

Dra. M^a del Carmen Martínez Ballesta

Dr. Ginés Benito Martínez Hernández

Dra. Cristina García Viguera

Dra. Eva Armero Ibañez

Dr. Manuel Tornel Martínez

Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (TAIDA). Escuela Internacional de Doctorado (EINDOC). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)

<https://estudios.upct.es/doctorado/3470/inicio>



Esta obra está bajo una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada (by-nc-nd): no se permite el uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.
http://es.creativecommons.org/blog/wp-content/uploads/2013/04/by-nc-nd.eu_petit.png

Prefacio

El 13º Workshop en Investigación Agroalimentaria para jóvenes investigadores (WIA2024) se celebró presencialmente el 13 de mayo de 2024 en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena. Contó con unos 50 asistentes, que pudieron conocer los principales avances en las recientes investigaciones de 30 doctorandos del Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (TAIDA) e interactuar en busca de sinergias y posible cooperación entre los Grupos de Investigación de los centros participantes (UPCT, CEBAS-CSIC e IMIDA).

La conferencia invitada fue a cargo de D. Carlos Ledó Orriach, ingeniero agrónomo y multi-emprendedor quien habló sobre “La I+D como pilar clave para emprender sin miedo” en base a su dilatada experiencia, especialmente como fundador y CEO de IDAI Nature en 2009 y de VEGANIC Nature en 2024. Pautó acertadamente las claves para animar a los doctorandos a poner en valor sus ideas e investigaciones y buscar en el emprendimiento una salida tras la Tesis Doctoral.

Como presidente del Comité Científico y Organizador del WIA2024, y Coordinador del Programa TAIDA, quiero resaltar en esta nueva anualidad la elevada calidad de las contribuciones científicas presentadas. Los planes de investigación expuestos por los doctorandos de primer año auguran avances significativos a corto plazo en el sector agroalimentario. Las presentaciones orales de los trabajos de investigación, realizadas por los doctorandos de segundo año en adelante, despertaron un gran interés científico y evidenciaron el notable potencial de los Equipos de Investigación involucrados en el doctorado en TAIDA. En nuestra Comisión Académica, apostamos por estos eventos científicos para que los investigadores en formación puedan adquirir durante su etapa predoctoral la capacidad de resumir y difundir sus resultados a un público heterogéneo en un tiempo limitado.

Prof. Dr. Francisco Artés Hernández

Coordinador del 13º Workshop en Investigación Agroalimentaria (WIA2024)

Universidad Politécnica de Cartagena, España

Índice

Presentación de los planes de investigación de nuevos doctorandos en el formato

'Tesis en 3 minutos'

Bloque I: Tecnología e Ingeniería de Alimentos

Impacto de altas presiones hidrostáticas y pasteurización térmica convencional, sobre el perfil fitoquímico y microbiológico de bebidas de cítricos-maqui, durante el almacenamiento	
F.J. Salar ^{1*} , P.M. Periago ² , P.S. Fernández ² , R. Domínguez-Perles ¹ , C. García-Viguera ¹	10
Determinación de compuestos fenólicos en nuevos híbridos de uva de mesa	
P. Crespo ^{1,2*} , M.I. Serrano ¹ , L. Martínez-Zamora ^{2,3} , F. Artés-Hernández ² , M. Tornel ¹	14
Subproductos vitivinícolas como moduladores de inflamación intestinal	
A. Costa-Pérez*, P. Sánchez-Bravo, R. Domínguez-Perles, S. Medina, C. García-Viguera	18
Revalorización de subproductos de <i>Citrus limon</i> mediante extracción asistida por microondas	
R. Zapata ^{1*} , L. Martínez-Zamora ^{1,2} , F. Melendreras ³ , F. Artés-Hernández ¹	22
Prácticas sostenibles para minimizar los residuos de brócoli y la huella de carbono en los hogares	
L. Rasines ^{1,2*} , N. Castillejo ^{1,2} , G. San Miguel ³ , E. Aguayo ^{1,2}	26
Efecto de la luz UV-B como estrés abiótico para potenciar la capacidad antioxidante de subproductos de tomate	
L. Mozafari ^{1*} , L. Martínez-Zamora ^{1,2} , Marina Cano-Lamadrid ¹ , F. Artés-Hernández ¹	30
Análisis de los parámetros de inactivación de <i>Lactobacillus</i> spp. mediante aplicación de tratamiento por altas presiones hidrostáticas	
M.T. Gómez-Hernández*, A. López-Gómez, G.B. Martínez-Hernández	34
Evolución de características físicas y químicas en el almacenamiento de ñampín morado (<i>Dioscorea trifida</i>)	
S.V. Medina-López ^{1,2*} , J. P. Fernández-Trujillo ² , M. S. Hernández-Gómez ^{1,3}	38
La aplicación de un choque térmico subletal aumenta la termorresistencia de <i>Bacillus subtilis</i> a tratamientos isotérmicos	
A. Luciano ^{1*} , S. Guillén ^{1,2} , P. Fernández Escámez ¹ , A. Palop Gómez ¹	42
Extracción asistida por ultrasonidos mediante sonda de compuestos fenólicos en subproductos de floretes de brocoli	
H. Seyeinzeinab ^{1*} , L. Martínez-Zamora ^{1,2} , M. Cano-Lamadrid ¹ , F. Artés-Hernández ¹	46
Evaluación <i>in vitro</i> de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de una bebida funcional obtenida a partir de subproductos agrícolas	
J.A Salas-Millán ^{1,2*} , A. Conesa-Bueno ² , E. Aguayo ¹	50
Diferencias en el peso molecular del Ácido Hialurónico producido por <i>Streptococcus</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp	
M. Victoria*, A. López-Cánovas, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez	54

Bloque II: Tecnología e Ingeniería de la Producción Vegetal

Fecundidad de <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae) alimentado con diferentes especies de ácaros astigmátidos	
M.C. Reche*, C. Grávalos, A.B. Abelaira, V. Balanza, A. Rodríguez-Gómez, P. Bielza	59
Optimizando el cultivo de verdolaga mediante intercropping y rotación con leguminosas: un estudio sobre la productividad y las comunidades bacterianas rizosféricas	
A. Carrascosa* ¹ , J.A. Pascual ¹ , M. Ros ¹ , J. Cuartero ² , A. DeSantiago ³ , S.A. Petropoulos ⁴ , M.M. Alguacil ¹	63
Regulación del metabolismo de la sacarosa en frutos de plantas de pimiento sometidas a estrés salino mediada por el uso de malla fotoselectiva roja	
A. Gálvez* ¹ , A. Albacete ² , F. M del Amor ¹ , J. López-Marín ¹	67
Ecoeficiencia de un sistema de cultivo en cascada	
F. Amoruso ^{1*} , M.D. De-Miguel ² , A. Signore ¹ , V.M. Gallegos-Cedillo ¹ , P.A. Gómez-Di Marco ³ , J. Ochoa ¹ , J.A. Fernández ¹	71
Análisis estructural del sistema de drenaje de un lisímetro de pesada transportable	
J.A. Nicolás-Cuevas* ¹ , M. Soler-Méndez ¹ , D. Parras-Burgos ² , J.M. Molina-Martínez ¹	75
Errores fundamentales en la evaluación contemporánea de la solución del suelo a partir de lecturas de conductividad	
R.C. Yudin-Fitzherbert ^{1*} , Y.C. Li ² , M.C. Martinez-Ballesta ¹	79
Desarrollos tecnológicos en sistemas de gestión precisa de cabezales de fertirrigación	
M. Soler ^{1*} , B. Hernández ¹ , N. Carrasco ¹ , J. Fernández ¹ , D. Parras ² , J.M. Molina ¹	83

Bloque III: Biotecnología

Control genético del quimiotipo en <i>Cannabis sativa</i> : más allá de las sintasas de cannabinoides	
A. Gila-Navarro*, M. Egea-Cortines, J. Weiss	88
Caracteres de crecimiento y de calidad de la canal en pollos de raza Gallina Murciana, Hubbard JA757 y su cruzamiento	
L. Martínez-Martínez ^{1*} , S. Rey-Antón ¹ , A. Vallecillos-Quijada ¹ , J. Orengo-Femenía ² , E. Armero-Ibáñez ¹	91

Bloque IV: Economía Agroalimentaria

¿Cómo incentivar la protección de sistemas agroforestales? Hallazgos de las preferencias de caficultores por adoptar buenas prácticas agrícolas	
M. Valenzuela ^{1*} , J.A. Zabala ² F. Alcón ¹	96

Organizadores



Universidad
Politécnica
de Cartagena

MEMBER OF



EUROPEAN
UNIVERSITY OF
TECHNOLOGY

CEBAS-CSIC

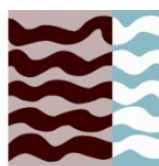
CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Medioambiental



Colaboradores



ETSia

Escuela Técnica

Superior de

Ingeniería

Agronómica



ESCUELA
INTERNACIONAL DE
DOCTORADO



Universidad Politécnica de Cartagena

Presentación de los planes de
investigación de nuevos
doctorandos en el formato
‘Tesis en 3 minutos’

Presentación divulgativa en 3 minutos de los Planes de Investigación de las Tesis en TAIDA a cargo de los doctorandos de 1º año

Doctorand@	Director/es	Título del Plan de Investigación
Elisa Orcajada Hermosilla	Antonio López Ginés Benito Martínez	Optimización de la tecnología de superenfriamiento para incrementar la vida útil de la carne fresca de cerdo
Laura Marín Durán	Alejandro Pérez	Incremento de la productividad del agua y nutrientes a través de la digitalización y de la bioestimulación en cultivos leñosos
Alfonso Sevillano Lozano	Antonio López Ginés Benito Martínez	Selección y microencapsulación por atomización de probióticos con especial producción de ácido hialurónico
Silvia Rey Antón	Eva Armero Eva Mocé	Desarrollo de un banco de germoplasma para la raza autóctona "Gallina Murciana"
Laura Martín Urios	Antonio López Ginés Benito Martínez	Cápsulas blandas veganas para envasado de complementos alimenticios
Carina Gutiérrez Paz	Juan Pablo Fernández M ^a Soledad Hernández	Evaluación del contenido de compuestos bioactivos en manzana de marañón (<i>Anacardium Occidentale</i>) y efecto de las operaciones de transformación en subproductos derivados
Carolina Adoración Paredes Romero	Antonio López Ginés Benito Martínez	Producción de colágeno mediante fermentación con microorganismos
José M^a Berral Hens	José Antonio Pascual Margarita Ros	Modelado del microbioma del suelo mediante la gestión de un compost adaptado supresor para el control de la fusariosis vascular de la lechuga iceberg (<i>Lactuca sativa</i> var. capitata) en el sureste español

Bloque I: Tecnología e Ingeniería de Alimentos

Impacto de altas presiones hidrostáticas y pasteurización térmica convencional, sobre el perfil fitoquímico y microbiológico de bebidas de cítricos-maqui, durante el almacenamiento

Impact of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization on the phytochemical and microbiological profile for citrus-maqui beverages, during storage

F.J. Salar^{1*}, P.M. Periago², P.S. Fernández², R. Domínguez-Perles¹, C. García-Viguera¹

¹Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS). Departamento Ciencia y Tecnología de Alimentos. CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo, 25, 30100, Murcia, España.

²Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*fjsalar@cebas.csic.es

Resumen

En el presente trabajo se compararon los efectos, sobre los compuestos fitoquímicos bioactivos y el perfil microbiológico, de las altas presiones hidrostáticas (HHP), como procesado no térmico y la pasteurización clásica (TP), como procesado térmico, en bebidas saludables de cítricos y maqui. Para ello se compararon los tratamientos de HHP a 450 MPa durante 180 s y TP a 85 °C durante 15 s. para determinar la vida útil se almacenaron las bebidas a 4 °C, durante 90 días. Los resultados demostraron que ambas tecnologías aseguran la estabilidad microbiológica, durante todo el período de almacenamiento. En cuanto a los compuestos fenólicos, las bebidas sometidas a HHP conservaron mejor los flavonoides que las pasteurizadas, durante el periodo de vida útil estudiado. Se puede concluir que las HHP son una alternativa eficaz que logra una inactivación microbiana efectiva, extendiendo, además, la vida útil de las bebidas de frutas, en cuanto a una mejor conservación de los compuestos bioactivos.

Palabras clave: antocianos; flavanonas; tecnología no térmica; stevia.

Abstract

The effects of high hydrostatic pressure (HHP) compared to thermal pasteurization (TP) were studied in healthy citrus-maqui beverages. The impact of the processing technologies on the microbiological and phytochemical profile was assessed by applying HHP treatment at 450 MPa for 180 s, and TP at 85 °C for 15 s. The shelf life was monitored during 90 days at 4 °C. Both processing technologies ensured microbiological stability throughout the storage period. Regarding phenolic compounds beverages subjected to HHP preserved the flavonoid content better than thermally-treated, during 90 day-storage period. It could be concluded that HHP is an effective alternative to thermal treatments, achieving effective microbial inactivation and extending the shelf life of fruit and vegetable-based beverages, by contributing to a better preservation of bioactive compounds.

Keywords: anthocyanins; flavanones; non-thermal technology; stevia.

1. INTRODUCCIÓN

Según estudios recientes más del 70% de los consumidores asocian las tecnologías emergentes no térmicas con una mejor calidad nutritiva/sensorial del alimento (1), a la vez que más respetuosas con el medio ambiente (2).

Además, los consumidores son cada vez más conscientes de la necesidad de incluir en sus dietas productos a base de frutas y verduras y con menor contenido de azúcares, por lo que la industria basa su estrategia en la adición de otros edulcorantes no calóricos, como es el caso de la stevia, en base a lo cual hemos realizado diversos trabajos previos (3), formulando bebidas en base a cítricos y maqui, con diversos endulzantes.

En cuanto a los diferentes métodos de procesado si bien la pasteurización clásica (TP) ha sido capaz de garantizar la seguridad alimentaria y conseguir un alto grado de inactivación enzimática, este procesado térmico tiende a degradar la calidad general de las bebidas, afectando a los perfiles fitoquímico, sensorial y físico-químico (4) y, por tanto, repercutiendo en la capacidad funcional de las mismas. Debido a lo anterior, se están implantando nuevas tecnologías no térmicas, como las altas presiones hidrostáticas (HHP), los campos eléctricos pulsados (PEF), los ultrasonidos (US), o la luz ultravioleta (UV). De entre ellas, la más extendida son las HHP, pues garantiza la seguridad, preservan las características organolépticas y nutricionales/fitoquímicas de las bebidas (5), a temperaturas moderadas, ya que no afectan a los enlaces covalentes durante el proceso de presurización, y por tanto las biomoléculas alimentarias se ven mínimamente degradadas.

Teniendo en cuenta lo anterior, el propósito del presente estudio fue la optimización del procesado, diseñado para la nueva bebida funcional de maqui-cítricos, desarrollada previamente, utilizando HHP (a 450 MPa/180 s), con el fin de minimizar la pérdida de compuestos bioactivos (especialmente antocianos y flavanonas) y, en consecuencia, aumentar las propiedades saludables de la bebida y mantener su seguridad a nivel microbiológico durante 90 días a 4 °C, en comparación con el tratamiento clásico de pasteurización (85 °C/15 s).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material y reactivos

El maqui fue proporcionado por Maqui en polvo New Life S.A. (Santiago, Chile), la stevia por Agriestevia S.L (Murcia, Spain) y las bebidas cítricas por Cítricos de Murcia S.L. (Murcia, España) y AMC Grupo Alimentación S.A. (Murcia, España).

Los solventes metanol y ácido fórmico 98% se adquirieron en PanReac (Barcelona, España) y los patrones: cianidina 3-O-glucosido ($\geq 98\%$ pureza) de TRansMIT (Geiben, Alemania), hesperidina ($\geq 98\%$ pureza) de Merck (Darmstadt, Alemania). Finalmente, el Agar Plate Count (PCA) y Agar Rosa de Bengala de Scharlab (Barcelona, España). Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura de un sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q Advantage A10 (Millipore, EE. UU.).

2.2 Diseño experimental

Se siguió la formulación, previamente desarrollada de maqui y cítricos (6), a la que se añadió stevia como edulcorante, para ser, posteriormente, procesadas mediante 1) pasteurización (85 °C 15 s) y 2) altas presiones hidrostáticas (450 MPa 180 s). Inmediatamente después las bebidas se almacenaron a 4 °C durante 90 días, tomando muestras a los días: 0, 7, 15, 30, 45, 60 y 90. Todas las determinaciones analíticas se llevaron a cabo por triplicado.

2.3 Análisis microbiológico

Las cuantificaciones de mohos y levaduras se realizaron sembrando las muestras en Agar Rosa de Bengala (RBA), seguido de incubación durante 5 días a 25 °C. Los recuentos de bacterias

aerobias mesófilas y psicrófilas se realizaron en medio Plate Count Agar (PCA), incubados durante 48 h a 30 °C y durante 10 días a 5 °C, respectivamente. Los recuentos microbianos se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). (4)

2.4 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó aplicando el método de Salar et al. (6) mediante HPLC-DAD. Los antocianos se cuantificaron como cianidina 3-*O*-glucósido a 520 nm. Las flavanonas se cuantificaron como hesperidina a 280 nm. Los resultados se expresaron como contenido total de antocianos o flavanonas en mg por 100 mL de bebida.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ SD ($n = 3$). Se realizó la prueba t de Student para comparar dos condiciones. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 19.0 (LEAD Technologies, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron y cuantificaron los antocianos (cianidinas y delfinidinas) y flavanonas individuales, descritos en trabajo previos del grupo (Salar et al. (6)), obteniendo concentraciones totales iniciales de antocianos y flavanonas, de 19.25 ± 0.24 mg/ 100 mL y 17.89 ± 0.12 mg/ 100 mL, respectivamente, en promedio, para los tratamientos de HHP y TP.

Durante el almacenamiento se observó una disminución general de los compuestos fenólicos en ambos tratamientos, si bien las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) entre HHP y TP, en la concentración de antocianos, mientras que si lo fueron ($p < 0.001$) para las flavanonas. Con respecto a los antocianos, la tasa de degradación fue gradual, con porcentajes finales de pérdida de 38 y 41%, para HHP y TP, respectivamente, tras los 3 meses de almacenamiento a 4 °C, (Fig. 1). Por otro lado, las bebidas tratadas por HHP lograron mantener constante la concentración inicial de flavanonas durante los 90 días de vida útil, con una pérdida final de tan sólo del 4%. Mientras que las bebidas procesadas por TP, sufrieron una pérdida progresiva de la concentración de flavanonas, alcanzando un 18% de pérdida final tras los 90 días (Fig. 2). Estos resultados confirmaron que los tratamientos con altas presiones conservan en mayor medida el contenido de los compuestos fenólicos de las bebidas formuladas, en comparación con el tratamiento térmico, como ha sido descrito en estudios previos (7).

En cuanto al análisis microbiológico, tanto para los microorganismos mesófilos totales como para los psicrófilos, los resultados fueron <10 UFC/mL, para todas las bebidas, independientemente del tipo de procesado (datos no mostrados), después de 90 días de vida útil. Para mohos y levaduras, los resultados fueron <100 UFC/mL para todas las condiciones (datos no mostrados) después de 90 días de almacenamiento.

4. CONCLUSIONES

La aplicación de HHP es efectiva para la conservación de la seguridad microbiológica y la estabilidad de todos los compuestos bioactivos (antocianos y flavanonas) presentes en las bebidas de cítricos-maqui. En concreto, tanto HHP como TP garantizan la seguridad microbiológica durante la vida útil estudiada. Respecto a los compuestos bioactivos, las HHP muestra una menor degradación, en relación a la pasteurización, de los flavonoides, durante el almacenamiento, preservando, por tanto, las propiedades saludables de las bebidas.

Debido a estos resultados, los HHP pueden considerarse como una alternativa efectiva al TP convencional en la industria alimentaria para la producción de bebidas a base de frutas con alta calidad funcional.

5. AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el MICINN (España), Proyecto número PID2019-104212RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 y F.J.S por beca FPU del programa del MICIU (España).

6. REFERENCIAS

1. Khouryieh HA. Novel and emerging technologies used by the U.S. food processing industry. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2021;67:102559. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102559>
2. Khan MK, Ahmad K, Hassan S, Imran M, Ahmad N, Xu C. Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2018;45:361–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.006>
3. Salar FJ, Agullo V, Perles-Dominguez R, García-Viguera C. Influence of Sweeteners (Sucrose, Sucralose, and Stevia) on Bioactive Compounds in a Model System Study for Citrus–Maqui Beverages. *Foods* [Internet]. 2022;11(15):2266. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/15/2266>
4. Salar FJ, Periago PM, Agulló V, García-Viguera C, Fernández PS. High Hydrostatic Pressure vs. Thermal Pasteurization: The Effect on the Bioactive Compound Profile of a Citrus Maqui Beverage. *Foods* [Internet]. 2021;10(10):2416. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/10/2416>
5. Salar FJ, Domínguez-Perles R, García-Viguera C, Fernández PS. Ifs and buts of non-thermal processing technologies for plant-based drinks' bioactive compounds. *Food Sci Technol Int* [Internet]. 2022;0(0):1–35. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/10820132221094724>
6. Salar FJ, Agulló V, García-Viguera C, Domínguez-Perles R. Stevia vs. Sucrose: Influence on the phytochemical content of a citrus–maqui beverage—a shelf life study. *Foods* [Internet]. 2020;9(2). Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/2/219>
7. da Silveira TFF, Cristianini M, Kuhnle GG, Ribeiro AB, Filho JT, Godoy HT. Anthocyanins, non-anthocyanin phenolics, tocopherols and antioxidant capacity of açai juice (*Euterpe oleracea*) as affected by high pressure processing and thermal pasteurization. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2019;55:88–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.001>

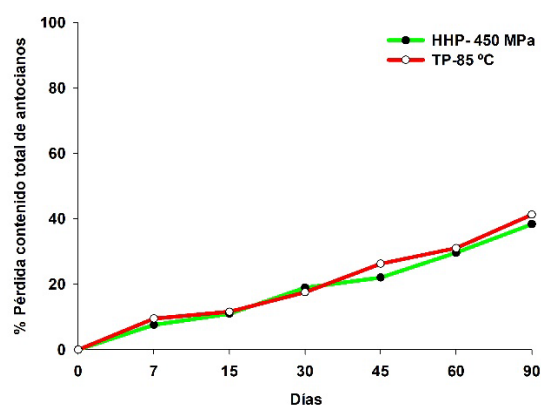


Fig. 1. Porcentaje de pérdida del contenido total de antocianos de bebidas sometidas a altas presiones hidrostáticas (HHP-450 MPa) y pasteurización térmica (TP- 85 °C), durante 90 días de almacenamiento a 4 °C.

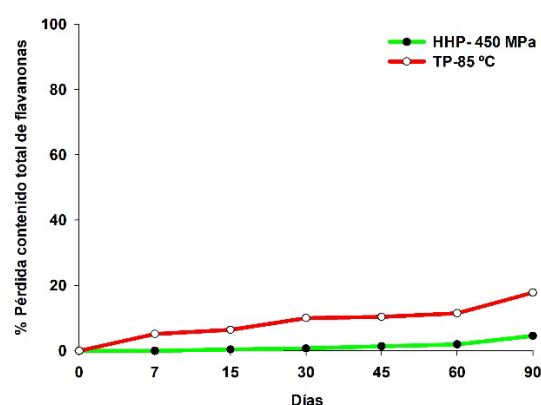


Fig. 2. Porcentaje de pérdida del contenido total de flavanonas de bebidas sometidas a altas presiones hidrostáticas (HHP-450 MPa) y pasteurización térmica (TP- 85 °C), durante 90 días de almacenamiento a 4 °C.

Determinación de compuestos fenólicos en nuevos híbridos de uva de mesa

Phenolic compounds of new table grape hybrids

P. Crespo^{1,2*}, M.I. Serrano¹, L. Martínez-Zamora^{2,3}, F. Artés-Hernández², M. Tornel¹

¹Equipo de Mejora de Uva de Mesa, Departamento Biotecnología, Genómica y Mejora Genética, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental. C/ Mayor, s/n, 30150, La Alberca, Murcia, España.

²Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Departamento de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

³Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*pablo.agro.crespo@gmail.com

Resumen

La Región de Murcia es un referente nacional en el cultivo de uva de mesa, siendo el principal productor y exportador del país, además cuenta con programas de obtención de nuevas variedades de uva de mesa que se cultivan por todo el mundo. El principal objetivo de este trabajo es el estudio de compuestos fenólicos individuales en nuevos híbridos de uva de mesa con calidad nutricional demostrada por sus elevados contenidos en Compuestos Fenólicos Totales (CFT) y en Capacidad Antioxidante Total (CAT). Los nuevos híbridos generados, tras el cruzamiento de Alicante Bouschet (AB) × Itumfifteen (IT-15), se definieron como híbridos 'de pulpa sin coloración' (PSC) y 'de pulpa con coloración total' (PCT). En las determinaciones de compuestos fenólicos individuales por cromatografía líquida, los híbridos PCT han registrado valores superiores en comparación a los híbridos PSC. En concreto, reportaron el doble de flavonoles y 12 veces más cantidad de antocianinas. En conclusión, los nuevos híbridos PCT están enriquecidos en compuestos bioactivos fundamentalmente en flavonoides (antocianinas y flavonoles).

Palabras clave: *Vitis vinifera* L.; uvas tintoreras; fitoquímicos; malvidina; kaempferol.

Abstract

The Region of Murcia is a national benchmark in the cultivation of table grapes, being the main producer and exporter in the country, also has programs for the development of new varieties of table grapes that are cultivated around the world. The main objective of this work is the study of individual phenolic compounds in new table grape hybrids with proven nutritional quality due to their high contents in Total Phenolic Compounds (CFT) and Total Antioxidant Capacity (CAT). The new developed hybrids, after the crossbreeding of Alicante Bouschet (AB) × Itumfifteen (IT-15), were defined as 'non-colored flesh' (PSC) hybrids and 'red flesh' (PCT) hybrids. In the determinations of individual phenolic compounds by liquid chromatography, the new PCT hybrids have obtained higher values compared to the PSC hybrids, specifically they were 2-fold higher in flavonols and 12-fold higher in anthocyanins. In conclusion, these new PCT hybrids are enriched in bioactive compounds, mainly flavonoids (anthocyanins and flavonols).

Keywords: *Vitis vinifera* L.; teinturier grapes; phytochemicals; malvidin; kaempferol.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se produce en el mundo aproximadamente la misma cantidad de uva de mesa que de uva destinada para vinificación, algo que históricamente es insólito (1). En este panorama, la Región de Murcia es un referente nacional en el cultivo de uva de mesa, siendo el principal productor y exportador del país, cuenta además con programas de obtención de nuevas variedades de uva de mesa que se cultivan por todo el mundo (2). El consumo de uva de mesa en España, Europa y en general en el mundo se consolida al alza, por su facilidad de consumo debido a la no presencia de semillas, piel fina y textura crujiente. Con gran aporte nutricional, a la uva se le asocia un importante contenido en compuestos nutraceuticos. Los compuestos nutricionales y fitoquímicos, diferenciados entre sí, pero actuando de forma conjunta, reportan propiedades beneficiosas para el ser humano y se presentan como fundamentales para un estilo de vida saludable (3). Los compuestos bioactivos de interés en uva de mesa son compuestos fenólicos y se clasifican en base a su estructura química y su complejidad en dos grandes grupos: flavonoides (flavonoles, antocianinas y flavan-3-oles) y no-flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos). El objetivo del presente trabajo fue el estudio de estos compuestos bioactivos de las uvas, potenciados en uvas de pulpa tinta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

El material vegetal estudiado ha sido fruto del cruzamiento de dos variedades: Alicante Bouschet cv. (AB) × Itumfifteen cv. (IT-15). Además de estos dos parentales, se trabajó con seis híbridos de la población resultante: híbridos con ‘pulpa sin colorear’ -PSC- (AB×IT_5, AB×IT_8 y AB×IT_14) e híbridos con ‘pulpa con coloración total’ -PCT- (AB×IT_17, AB×IT_33 y AB×IT_50). Todos los híbridos fueron verificados con calidad organoléptica semejante a variedades comerciales y con calidad fisicoquímica demostrada de acuerdo a estándares comerciales. Los muestreos tuvieron lugar en la ‘Finca Cuatro Vientos’, una finca experimental de Investigación y Tecnología de Uva de Mesa (ITUM) en Blanca (Murcia, España). Se llevaron a cabo en julio y agosto durante 2022 y 2023. El contenido de sólidos solubles totales promedio en la cosecha varió de $16,1 \pm 0,5$ a $23,8 \pm 5,8$ °Brix, mientras que la acidez titulable osciló entre $3,7 \pm 0,9$ a $6,3 \pm 0,9$ g de ácido tartárico L⁻¹. Los promedios de temperatura en la toma de muestras fueron de 25,5 y 26,5 °C y la humedad relativa de 44,5 a 46 %. Las muestras fueron conservadas a -80 °C tras su recolección hasta la preparación y determinación de los compuestos fenólicos individuales durante noviembre y diciembre de 2022 y 2023.

2.2 Preparación de muestras

Se tomaron un total de 20 bayas por muestra con las que se obtuvo el extracto para proceder a las determinaciones de compuestos fenólicos individuales por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (U-HPLC). Para ello se trabajó con la parte comestible (piel y pulpa) de las muestras liofilizadas realizando una extracción metanólica conforme a lo descrito por Crespo et al. (4).

2.3 Determinación de compuesto fenólicos individuales

Un volumen de 10 µL de extracto filtrado de las muestras fue empleado para los análisis de U-HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) según Artés-Hernández et al. (5). Se identificaron y cuantificaron ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoles y antocianinas. Estos valores se reportaron en g de equivalentes de ácido gálico (GAE) kg⁻¹ de peso seco (ps), g resveratrol kg⁻¹ ps, g quercitina kg⁻¹ ps y g malvidina kg⁻¹ ps, respectivamente.

2.3 Tratamiento estadístico

Se ha realizado un análisis de estadístico con el programa SPSS Statistics (v. 25 IBM, Armonk, Nueva York, EE.UU.). Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de un único factor, donde el factor fue la variedad o híbrido y las variables han sido cada una de las mediciones efectuadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido en compuestos fenólicos totales (CFT) en los híbridos se calculó como la suma de los compuestos individuales. La cantidad de compuestos fenólicos individuales varió entre $2,24 \pm 0,33$ y $5,19 \pm 0,61$ g GAE kg^{-1} ps de ácidos fenólicos, entre $0,06 \pm 0,02$ y $0,11 \pm 0,00$ g resveratrol kg^{-1} ps de estilbenos, entre $0,47 \pm 0,10$ y $1,92 \pm 0,02$ g quercitina kg^{-1} ps de flavonoles, y entre $0,14 \pm 0,05$ y $3,79 \pm 1,13$ g malvidina kg^{-1} ps de antocianinas. Las mayores diferencias entre híbridos PSC y PCT se encontraron en flavonoles y antocianinas, en concreto los híbridos PCT mostraron el doble de flavonoles y 12 veces más cantidad de antocianinas en comparación con los de PSC.

Estudios previos han demostrado la presencia de diversos ácidos fenólicos en uva, de similar composición, pero con gran variabilidad en la cantidad en función a la variedad de uva y su cultivo. Lago-Vanzela et al. (6) identificaron los ácidos caftarico, coutárico y fertárico en las variedades de uva de mesa 'BRS Morena' y 'BRS Clara'. Mota et al. (7) identificaron los compuestos de ácido gálico y ácido cafeico en 'Alphonse Lavallée' y en 'Cardinal'. Se detectaron valores similares a los del presente trabajo en cuanto a estilbenos en un estudio comparativo de 67 uvas de mesa sin semillas del Banco de Germoplasma de Vid de 'El Encín' (Madrid) realizado por Izcara et al. (8), que identificaron y cuantificaron el resveratrol entre $0,03 \pm 0,01$ y $0,2 \pm 0,03$ mg 100 g^{-1} pf. Al respecto de los flavonoles, con el kaempferol como principal compuesto en uva de mesa, Muzolf-Panek y Waśkiewicz (9) encontraron los mismos valores respecto a este trabajo para la variedad 'Black Magic', valores hasta dos veces superiores en 'Autumn Royal' e inferiores en 'Red Globe'. En cuanto al contenido en antocianinas se detectaron grandes diferencias entre uvas PSC y PCT de nuestro trabajo. La baja cantidad de antocianinas encontradas en híbridos PSC son comparables con valores de $0,17 \text{ g kg}^{-1}$ pf mostrados por Artés-Hernández et al. (5) en uva de mesa 'Napoleón'. La alta cantidad de antocianinas encontradas en híbridos PCT son comparables con valores de $0,7 \text{ g kg}^{-1}$ pf en la piel y $0,03 \text{ g kg}^{-1}$ pf en la pulpa en total obtenidos por Guan et al. (10) en la variedad tintorera 'Yan-73'.

4. CONCLUSIONES

Los nuevos híbridos PCT están enriquecidos nutricionalmente en compuestos fenólicos, especialmente en ácidos fenólicos y estilbenos y con un aporte extraordinario en flavonoides (antocianinas y flavonoles). Nuestros resultados contribuyen a las empresas del sector de uva de mesa a brindarles la posibilidad de verificar la riqueza a nivel de compuestos fenólicos de acuerdo con las características particulares de piel y pulpa de las variedades que cultiven.

5. AGRADECIMIENTOS

El contrato de P. Crespo está cofinanciado por fondos Europeos FEDER (60%) y regionales del IMIDA (40%) bajo el proyecto "Desarrollo de nuevos programas de mejora" para el período 2023-2027. El contrato L. Martínez-Zamora ha sido financiado por el Programa de Recualificación del Sistema Universitario Español (NextGenerationUE), modalidad Margarita Salas, de la Universidad de Murcia.

6. REFERENCIAS

1. OIV. Annual Assessment of the World Vine and Wine Sector in 2022. 2023;
2. Crespo P. Panorama actual de la uva de mesa: Rol de España y principales novedades. Bibl Hortic [Internet]. 2023;1-13. Available from: https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/panorama_actual_de_la_uva_de_mesa_2023
3. FAO and OIV. Table and Dried Fao-Oiv Focus 2016. 2016. 64 p.
4. Crespo P, Martínez-Zamora L, Artés-Hernández F, Tornel M. New table grape hybrids development from teinturier population with enhanced phytochemical quality. Sci Hortic (Amsterdam). 2024;326(December 2023).
5. Artés-Hernández F, Artés F, Tomás-Barberán FA. Quality and enhancement of bioactive phenolics in cv. Napoleon table grapes exposed to different postharvest gaseous treatments. J Agric Food Chem.

2003;51(18):5290–5.

6. Lago-vanzela ES, Da-silva R, Gomes E, García-romero E, Hermosín-guti I. Phenolic Composition of the Brazilian Seedless Table Grape Varieties BRS Clara and BRS Morena. 2011;8314–23.
7. Mota A, Pinto J, Fartouce I, Correia MJ, Costa R, Carvalho R, et al. Chemical profile and antioxidant potential of four table grape (*Vitis Vinifera*) cultivars grown in Douro region, Portugal. Cienc e Tec Vitivinic. 2018;33(2):125–35.
8. Izcarra S, Morante-Zarcelero S, de Andrés MT, Arroyo T, Sierra I. A comparative study of phenolic composition and antioxidant activity in commercial and experimental seedless table grapes cultivated in a Mediterranean climate. J Food Meas Charact [Internet]. 2021;15(2):1916–30. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00760-2>
9. Muzolf-Panek M, Waśkiewicz A. Relationship between Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Color Parameters of Red Table Grape Skins Using Linear Ordering Analysis. Appl Sci. 2022;12(12).
10. Guan L, Li J, Fan P, Chen S, Fang J, Li S, et al. Anthocyanin Accumulation in Various Organs of a Teinturier Cultivar (*Vitis vinifera* L.) during the Growing Season. 2012;(June).

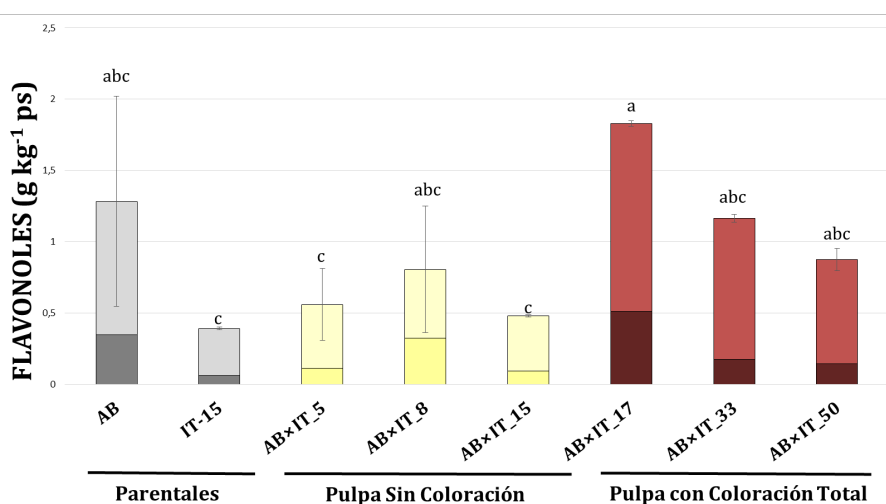


Figura 1. Flavonoles determinados en bayas [piel (barra inferior) + pulpa (barra superior)] de los parentales estudiados, AB: ‘Alicante Bouschet’, IT-15: ‘Itumfifteen’, y los híbridos de la población en estudio AB×IT_i. Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de los años de estudio 2022 y 2023. Diferentes letras representan diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,05$). ps: peso seco.

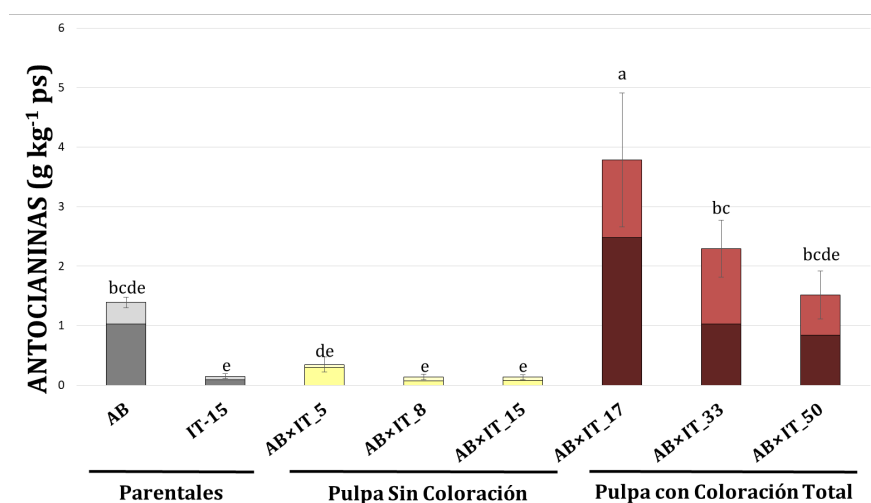


Figura 2. Antocianinas determinados en bayas [piel (barra inferior) + pulpa (barra superior)] de los parentales estudiados, AB: ‘Alicante Bouschet’, IT-15: ‘Itumfifteen’, y los híbridos de la población en estudio AB×IT_i. Los resultados mostrados son el promedio y desviación estándar de los años de estudio 2022 y 2023. Diferentes letras representan diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,05$). ps: peso seco.

Subproductos vitivinícolas como moduladores de inflamación intestinal

Winery byproducts as modulators of intestinal inflammation

A. Costa-Pérez*, P. Sánchez-Bravo, R. Domínguez-Perles, S. Medina, C. García-Viguera

Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS), Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario Espinardo-25, 30100, Espinardo, Murcia, España.

*acosta@cebas.csic.es

Resumen

Los subproductos del vino constituyen materiales infrautilizados, fuente de compuestos (poli)fenólicos con capacidad de mitigar procesos inflamatorios, como los asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal. La estabilización de dichos materiales para su utilización como ingrediente alimentario, mediante la aplicación de procesos térmicos modifica el perfil (poli)fenólico de estos materiales. Por lo tanto, son necesarias caracterizaciones adicionales en relación con la actividad anti-inflamatoria de raspón, bagazo y lías de vino. Este análisis evidenció la capacidad de los extractos (poli)fenólicos obtenidos de regular marcadores y mediadores de inflamación intestinal (óxido nítrico, así como las interleucinas IL-6, IL-8 y TNF- α), *in vitro*, evidenciando su interés como potenciales ingredientes funcionales.

Palabras clave: Subproductos vitivinícolas; Deshidratación térmica; Polifenoles; inflamación intestinal; ingrediente funcional.

Abstract

Wine by-products constitute underused materials, a source of (poly)phenolic compounds with the capacity to mitigate inflammation, such as those associated with inflammatory bowel disease. The stabilization of these materials for their use as a food ingredient, through the application of thermal processes, would modify the (poly)phenolic profile of these materials. Thereby, additional characterizations concerning the anti-inflammatory capacity of stabilized grape stems, grape pomace, and wine lees are required. This analysis showed the capacity of the (poly)phenolic extracts obtained to regulate the expression of markers and mediators of intestinal inflammation (nitric oxide, as well as the interleukins IL-6, IL-8, and TNF- α), *in vitro*, suggesting their interest as potential functional ingredients.

Keywords: Winery by-products; Thermal dehydration; (Poly)phenols; intestinal inflammation; functional ingredient.

1. INTRODUCCIÓN

La uva (*Vitis vinifera* L.) es un fruto empleado en una proporción significativa en la elaboración de vino. Esta actividad socioeconómica está asociada con la producción de grandes cantidades de subproductos sólidos (raspón y bagazo) y semisólidos (lías del vino). La falta de procesos de valorización adecuados para estos subproductos hace que tengan un impacto negativo en medio ambiente, así como en la sostenibilidad y competitividad de las industrias vitivinícolas (1). La caracterización de estos materiales en relación con su contenido en compuestos polifenólicos bioactivos, ha permitido el desarrollo de nuevas alternativas de valorización de los subproductos del vino. En estos materiales, el perfil polifenólico está

representado por cinco subclases: proantocianidinas y derivados de catequinas, ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoles y antocianos (2). Con base en esta composición, los subproductos vitivinícolas podrían constituir fuentes alternativas como compuestos nutraceuticos con una notable actividad biológica (antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora) (3), estrechamente relacionada con la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal (4).

El objetivo del trabajo fue evaluar los subproductos vitivinícolas (raspón, bagazo y lías de vino) estabilizados en relación a su capacidad para modular la expresión de marcadores y mediadores inflamatorios (óxido nítrico (NO) y las interleucinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- α , en un modelo *in vitro* de inflamación intestinal.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Reactivos químicos

Los patrones de catequina, ácido clorogénico, resveratrol, quercetina glucósido y cianidina 3-O-glucósido se adquirieron en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los solventes grado LC-MS de JT Baker (Phillisburg, NJ, EEUU). El agua ultrapura fue MilliQ®. Los kits de IL-6, IL-8 y TNF- α de Abcam (Cambridge, UK). Tripsina-EDTA, medio EMEM, L-glutamina, suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina y aminoácidos esenciales de Gibco (ThermoFisher Scientific, Madrid, España).

2.2 Material vegetal y procesado

Las Bodegas Viña Elena (Jumilla, Murcia, España) suministró los subproductos vitivinícolas (raspón, bagazo y lías) procedentes de uva (*Vitis vinifera* L. var. Monastrell) de cultivo ecológico, los cuales se desecaron aplicando un gradiente de 75-60 °C durante 10 horas, seguido de un postsecado a 40 °C, hasta alcanzar un peso constante. El material estabilizado fue molido y conservado a temperatura ambiente, protegido de la luz hasta procesado para la obtención de extractos polifenólicos.

2.3 Determinación del perfil polifenólico cualitativo y cuantitativo por HPLC-PDA-ESI-MSn

La separación cromatográfica y el análisis por espectrometría de masas se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Costa-Pérez et al., (2).

2.4 Línea celular, modelo de barrera intestinal monocapa

La línea celular colorrectal humana Caco-2 (ATCC®HTB37, Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD, USA)) fue cultivada de acuerdo con las condiciones descritas por Costa-Perez et al., (3).

2.5 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.01$) y las diferencias detectadas fueron categorizadas de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Tukey ($n=6$). Programa SPSS 25.0 (Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de los subproductos de la industria vitinícola estabilizados mediante un proceso térmico de deshidratación se evaluó mediante el análisis del perfil de marcadores y mediadores inflamatorios (óxido nítrico (NO), y las interleucinas IL-6, IL-8 y TNF- α (4)), cuya expresión en un modelo *in vitro* de barrera intestinal monocapa fue inducida mediante la aplicación de la interleucina proinflamatoria IL-1 β .

De forma general, los extractos (hidrometanólicos) polifenólicos de raspón, bagazo y lías de vino evidenciaron capacidad para disminuir un 50%, de media, la expresión de NO, siendo el bagazo el subproducto cuyo contenido polifenólico desarrolló esta actividad biológica de forma más eficiente (Fig. 4-A).

En relación con la interleucina proinflamatorio IL-6, su desregulación es un factor crítico para el desarrollo de inflamación crónica (5). Los extractos polifenólicos de los subproductos liofilizados indujeron modificaciones en la expresión de IL-6 específicos para cada uno de ellos. En tanto que los extractos de raspón y bagazo redujeron su expresión, esta solo fue estadísticamente significativa para el bagazo (Fig. 4-B). En el caso de las lías del vino se observa un aumento de la secreción de IL-6 (Fig. 4-B), lo que podría estar relacionado con un aumento de la respuesta inflamatoria asociada con la presencia de fragmentos peptídicos o lipopolisacáridos de bacterias lácticas y levaduras responsables de la fermentación del mosto durante la elaboración de vino.

Los niveles del mediador proinflamatorio IL-8, un factor quimiotáctico y de activación de células inmunocompetentes implicadas en los procesos inflamatorios (5), inducidos por IL-1 β fueron reducidos de forma estadísticamente significativa por los extractos polifenólicos de todos los subproductos analizados en una proporción equivalente (Fig. 4-C).

Finalmente, el análisis del efecto modulador de la expresión del mediador proinflamatorio TNF- α evidenció una reducción significativa de su síntesis mediada por el perfil polifenólico de las lías de vino y, en menor medida, del raspón, en tanto que no fue detectada capacidad moduladora de esta interleucina por parte de la fracción polifenólica del bagazo (Fig. 4-D). Este resultado es relevante dadas las funciones inmunomoduladoras de esta interleucina durante el proceso inflamatorio, en relación con la proliferación celular, su maduración y la diferenciación hacia células presentadoras de antígeno y células efectoras y la inducción de necrosis (que contribuye a perpetuar el estado inflamatorio) (6).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren un potencial interés de los subproductos enológicos como ingredientes funcionales de utilidad en la prevención de procesos inflamatorios y, de forma específica de la enfermedad inflamatoria intestinal. No obstante, para su aplicación práctica y utilización futura, será preciso el análisis de la bioaccesibilidad de la fracción polifenólica caracterizada en el presente trabajo, en relación con sus propiedades antiinflamatorias y confirmar la persistencia o modificación de tales capacidades biológicas, reforzando así el potencial de estos residuos alimentarios como nuevo recurso biotecnológico de alto valor añadido.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido cofinanciada por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Fundación de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia - Fundación Séneca, a través del proyecto European Union-Next Generation EU PRTR-C17.I1. Asimismo, este trabajo ha sido cofinanciado por el Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación de España y fondos European Union-NextGenerationEU/PRTR CNS2022-135588, MCIN/AEI /10.13039/501100011033. El contrato de Paola Sánchez-Bravo está financiado por una beca del Ministerio de Universidades de España con el objetivo de formar jóvenes doctores (Margarita Salas, 04912/2021), aplicando fondos European Union-Next Generation EU.

6. REFERENCIAS

1. Machado NFL, Domínguez-Perles R. Addressing Facts and Gaps in the Phenolics Chemistry of Winery By-Products. *Molecules*. 2017; 22(2).
2. Costa-Pérez A, Medina S, Sánchez-Bravo P, Domínguez-Perles R, García-Viguera C. The (Poly)phenolic Profile of Separate Winery By-Products Reveals Potential Antioxidant Synergies. *Molecules*. 2023; 28(5): 2081.
3. Costa-Pérez A, Sánchez-Bravo P, Medina S, Domínguez-Perles R, García-Viguera C. Bioaccessible Organosulfur Compounds in Broccoli Stalks Modulate the Inflammatory Mediators Involved in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci*. 2024; 25: 800.
4. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*. 2019; 14(4): 991–1014.

5. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007; 15(6): 252-9.
6. Huang FC. The Interleukins Orchestrate Mucosal Immune Responses to Salmonella Infection in the Intestine. *Cells*. 2021; 10(12): 3492.

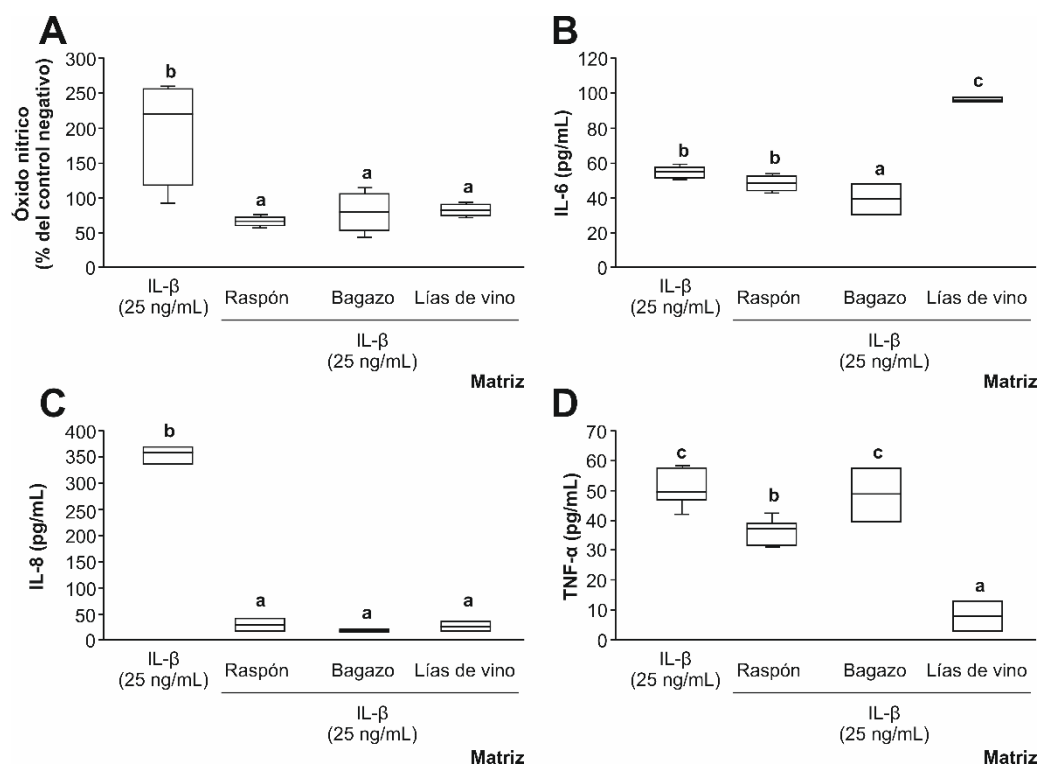


Figura 1. Capacidad del extracto de subproductos del vino, rico en polifenoles, para modular el óxido nítrico (A) y las interleucinas IL-6, (B), IL-8 (C) y TNF-α (D), marcadores secretados por las células Caco-2 expuestas a un estímulo inflamatorio (25 ng/mL IL-1β). Las letras minúsculas distintas indican valores significativamente diferentes en $p < 0.01$ según los análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey ($n = 6$).

Revalorización de subproductos de *Citrus limon* mediante extracción asistida por microondas

Revalorization of *Citrus limon* by-products through microwave assisted extraction

R. Zapata^{1*}, L. Martínez-Zamora^{1,2}, F. Melendreras³, F. Artés-Hernández¹

¹Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Departamento de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

³Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y la Alimentación/CTCN. C/Concordia s/n, 30500, Molina de Segura, Murcia, España.

*rosa.zapata@upct.es

Resumen

Los residuos generados de la industria cítrica alcanzan el 40% de su producción, siendo principalmente pieles. Estos desechos contienen una elevada cantidad de compuestos fenólicos, incluso mayor que las partes consumidas, lo que hace interesante su revalorización mediante su extracción y aprovechamiento. El objetivo ha sido optimizar la extracción asistida por microondas (MWAE) de compuestos bioactivos en pieles de limón, como tecnología verde innovadora. Se ha observado una elevada eficiencia de extracción optimizando los parámetros de temperatura, tiempo y porcentaje de etanol:agua del disolvente. Los compuestos fenólicos totales (CFT) y la capacidad antioxidante total (CAT) de los extractos confirman recuperaciones hasta un 157% y un 152% superiores. Ello permitirá una elevada recuperación y menor consumo de disolventes, energía y tiempo siendo la MWAE una de las técnicas más prometedoras por su rendimiento y rapidez.

Palabras clave: Subproducto; *Citrus limon*; extracción; tecnologías verdes; flavonoides.

Abstract

The waste generated from citrus industry reaches 40% of the total production, being mainly composed of skins. These byproducts contain high amounts of phenolic compounds, even higher than the parts consumed; so, they can be revalued through their extraction and application. The objective has been to optimize the microwave assisted extraction (MWAE) of bioactive compounds in lemon peels, as an innovative green technology. Results report high extraction efficiency by optimizing the parameters of temperature, time, and the ethanol-to-water ratio of the solvent. The total phenolic compounds (TPC) and total antioxidant capacity (TAC) of the extracts confirm recoveries up to 157% and 152%. This will allow for high recovery and less consumption of solvents, energy, and time, with MWAE being one of the most promising techniques due to this performance and speed.

Keywords: Byproduct; *Citrus limon*; extraction; green technologies; flavonoids.

1. INTRODUCCIÓN

La cadena de suministro alimentario se divide en varias etapas desde la producción hasta el consumo. En todas ellas se afronta el grave problema existente de la pérdida y el desperdicio alimentario. La magnitud de las pérdidas varía en función del estado y la naturaleza del producto. En el caso de frutas y hortalizas se alcanzan pérdidas de hasta el 40% de la producción global, lo que supone un impacto económico y medioambiental negativos. Encuadrar esta industria en un

modelo de economía circular es clave para alcanzar su desarrollo sostenible. Para ello, una de las estrategias adoptadas es la revalorización de los subproductos mediante la extracción y aprovechamiento de los compuestos bioactivos que contienen con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas.

Se han desarrollado numerosas metodologías de extracción para reducir costes, disolventes y aumentar la eficiencia en los compuestos bioactivos extraídos. Destacan Tecnologías Verdes que no requieren tratamiento térmico. Los resultados obtenidos mediante fluidos supercríticos, ultrasonidos (USAE), microondas (MWAE) y tratamiento enzimático (EAE) son muy prometedores (1). La técnica MWAE emplea radiación electromagnética. Esta energía no ionizante facilita el movimiento molecular por conducción iónica y rotación de dipolos, lo que produce fricción entre las moléculas y calor. Se favorece la migración de los compuestos bioactivos del interior de las células al disolvente, reduciendo el tiempo, energía y cantidad de disolvente (2).

Los cítricos son una fuente de multitud de metabolitos secundarios, especialmente compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) y ácidos orgánicos. Para la industria del zumo se destina cerca del 80% de la producción cítrica total, donde se desecha entre el 40 y el 60% en peso de la fruta, entre semillas, pieles y pulpa. Los subproductos generados son ricos en polifenoles, por lo que interesa su revalorización (3). A pesar de los estudios publicados, es necesario optimizar las condiciones para aumentar la eficiencia y rendimiento de extracción (4).

El objetivo ha sido la extracción de compuestos fenólicos de pieles de *Citrus limon* mediante MWAE optimizando las proporciones de etanol y agua del disolvente y las condiciones de temperatura y tiempo para lograr la mayor eficiencia y rendimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales, reactivos e instrumentación

Subproductos de pieles de limón (*Citrus limon*). Reactivo de Folin Ciocalteu 2 N, NaOH, Na₂CO₃, Trolox, ácido gálico y ABTS de Sigma-Aldrich. Etanol de grado pharma de PanReac y agua ultrapura (18,2 MΩcm, desionizador Milipore). Liofilizador Telstar® LyoBeta (Terrassa, España). Molinillo (tamaño de poro < 0,1 mm). Microondas Milestone SK-10 Ethos up (Italia). Centrífuga Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania). Lector de placas Tecan Infinite M200 (Mäneford, Suiza).

2.2 Metodología

Previo a la extracción, las pieles de limón se secaron por liofilización y se molieron con un tamaño de poro inferior a 0,1 mm para obtener un material homogéneo. Se prepararon muestras de 2 g de subproducto y se sometieron a una extracción sólido-líquido asistida por microondas. En todas ellas se utilizaron 20 mL de disolvente y se sometieron a 12 tratamientos con tres réplicas cada uno (n=3). Las variables estudiadas fueron: el disolvente (100% agua, 50%:50% etanol:agua y 75%:25% etanol:agua), la temperatura (35 °C y 50 °C) y el tiempo (5 y 20 min). Se tomó como control (CTRL) el extraído con 0:100 etanol:agua y sin tratamiento MWAE. Realizadas las extracciones se centrifugaron las muestras durante 10 min a 3220 g, se aislaron los sobrenadantes mediante filtros PA y PTFE 0,45 µm y se conservaron a -80 °C hasta los análisis.

Se determinaron los compuestos fenólicos totales (CFT), en base a Singleton et al., en placas de 96 pocillos (5). Sobre 19 µL de muestra se adicionaron 29 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y, pasados tres minutos, 193 µL de una solución de NaOH (2%) y Na₂CO₃ (0,4%). Tras 1 h de incubación en oscuridad a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 750 nm. La calibración por patrón externo permitió expresar la concentración de CFT en g de ácido gálico (GAE) kg⁻¹ de peso seco (ps). También se determinó la capacidad antioxidante total (CAT) por el método del radical libre ABTS, adicionando a 11 µL de cada muestra, 200 µL de la disolución de ABTS 7 mM ajustada a pH 5 con tampón acetato. Pasados 30 min se leyó la absorbancia a 414 nm (6). Estos resultados se expresaron como g Trolox eq kg⁻¹ ps.

2.3 Tratamiento estadístico

La significancia estadística de las diferencias se evaluó con el software Graph Pad Prism (v.8.0.2) mediante test ANOVA de dos vías y prueba t-Student de Welch.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la determinación de los CFT y la CAT de las extracciones de piel de limón por microondas con cada variable continua evaluada (tiempo, temperatura y % de etanol:agua) se determinaron los porcentajes en los que estos valores superaban lo reportado por el CTRL. En la Fig. 1 y 2 están representados dichos porcentajes para los análisis de CFT y CAT, respectivamente. Así, los parámetros que proporcionan mayores porcentajes son los más adecuados. En ambas Figuras se puede observar que al utilizar el tratamiento MWAE y cierta concentración de etanol en el disolvente el rendimiento en la extracción mejora considerablemente con respecto al CTRL.

Tanto para CFT como para CAT se ha comprobado que existen diferencias significativas entre los porcentajes de etanol utilizados (0%, 50% y 75%), obteniéndose mayor rendimiento con un 50:50 etanol:agua, coincidiendo con las observaciones de Imeneo et al. (4). Por esta razón, se van a comparar los valores proporcionados con los diferentes parámetros (tiempo y Tª) solo para esta proporción de etanol:agua. La prueba t-Student con un 95% de confianza confirma que para CFT no existen diferencias entre usar 30 °C o 50 °C, mientras que para CAT sí las hay, resultando mejor la mayor Tª. Por otro lado, la misma prueba confirma que para CFT sí hay diferencias entre los tiempos de aplicación de MW (5 y 20 min), siendo mejor el mayor tiempo, tal y como evidenciaron Kumar et al. (7), mientras que para CAT el tiempo de MW no supone diferencia para 50 °C, pero sí a 35 °C, resultando mejor 5 min, aunque sin excesiva variación.

4. CONCLUSIONES

Se ha confirmado que la extracción asistida por microondas es una tecnología verde muy prometedora debido a su alta eficiencia y bajo tiempo necesario. La evaluación de las variables continuas (porcentaje de etanol en la disolución acuosa, temperatura y tiempo) concluyó que las condiciones óptimas para la extracción son 50:50 etanol:agua, 50 °C y 20 min. De esta manera, aumentan considerablemente los CFT y la CAT extraídos con respecto a otras condiciones.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la Ayuda PID2021-1238570B-100, financiada por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y FEDER, y la ayuda PRTR-C17.I1 AGROALNEXT, financiada por la UE NextGenerationEU/PRTR y la Fundación Séneca de la CARM. R. Zapata agradece a la UPCT su beca predoctoral FPI – RV-171/23 y L. Martínez-Zamora el contrato postdoctoral Margarita Salas de la UM financiado por la UE NextGenerationEU/PRTR.

6. REFERENCIAS

1. Artés-Hernández F, Martínez-Zamora L, Cano-Lamadrid M, Hashemi S, Castillejo N. Genus Brassica By-Products Revalorization with Green Technologies to Fortify Innovative Foods: A Scoping Review. Vol. 12, Foods. MDPI; 2023.
2. Cano-Lamadrid M, Martínez-Zamora L, Castillejo N, Artés-Hernández F. From Pomegranate Byproducts Waste to Worth: A Review of Extraction Techniques and Potential Applications for Their Revalorization. Vol. 11, Foods. MDPI; 2022.
3. Sharma P, Vishvakarma R, Gautam K, Vimal A, Kumar Gaur V, Farooqui A, et al. Valorization of citrus peel waste for the sustainable production of value-added products. Vol. 351, Bioresource Technology. Elsevier Ltd; 2022.
4. Imeneo V, Romeo R, De Bruno A, Piscopo A. Green-sustainable extraction techniques for the recovery of antioxidant compounds from “citrus Limon” by-products. J Environ Sci Health B. 2022;57(3):220–32.
5. Singleton V L, Rossi J A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16:144–58.
6. Martínez-Zamora L, Castillejo N, Artés-Hernández F. Uv-b radiation as abiotic elicitor to enhance phytochemicals

and development of red cabbage sprouts. Horticulturae. 2021 Dec 1;7(12).

7. Kumar B, Smita K, Kumar B, Cumbal L, Rosero G. Microwave-Assisted Extraction and Solid-Phase Separation of Quercetin from Solid Onion (*Allium cepa* L.). Separation Science and Technology (Philadelphia). 2014 Nov 2;49(16):2502–9.

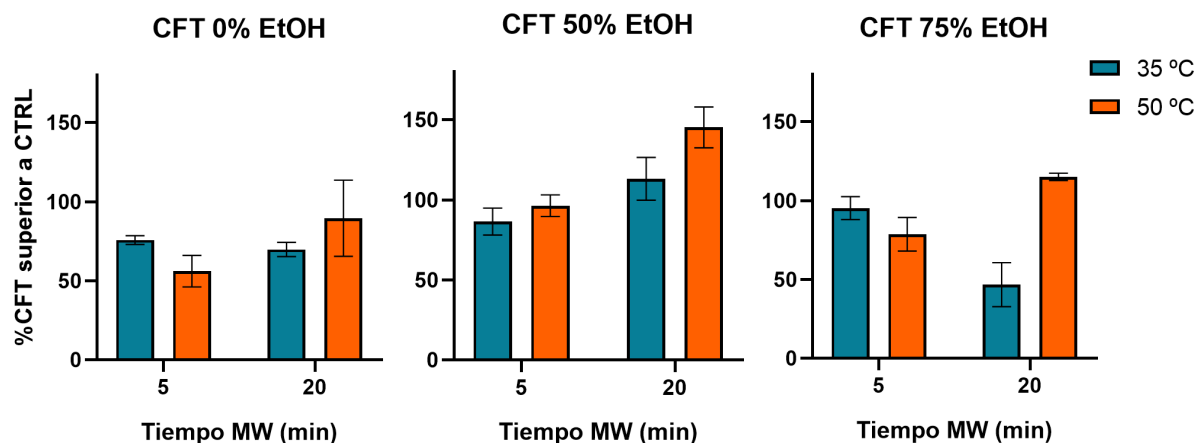


Figura 1. Porcentaje de compuestos fenólicos totales (CFT) superior a la muestra control (CTRL) aplicando los diferentes tratamientos con las variables: tiempo de aplicación de MW, T^a y porcentaje de EtOH:H₂O.

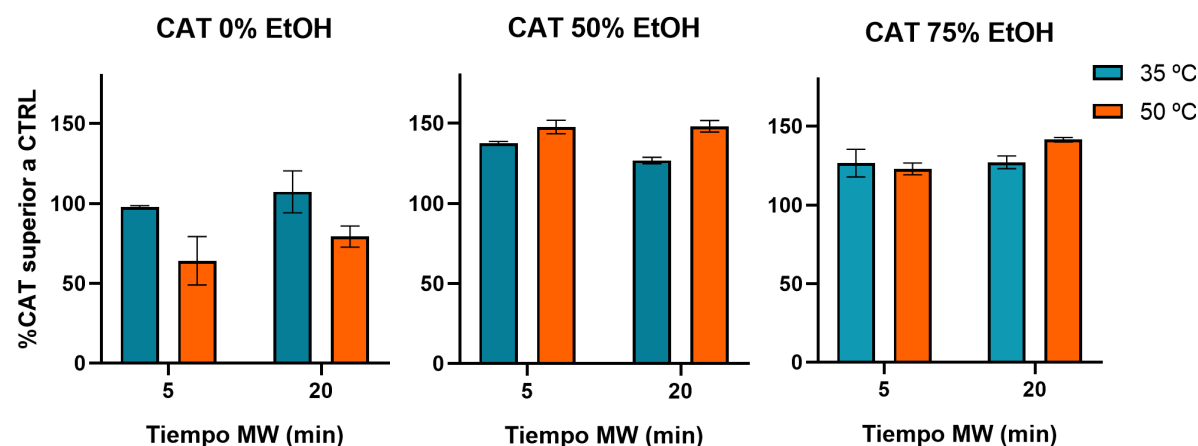


Figura 2. Porcentaje de capacidad antioxidante total (CAT) superior a la muestra control (CTRL) aplicando los diferentes tratamientos con las variables: tiempo de aplicación de MW, T^a y porcentaje de EtOH:H₂O.

Prácticas sostenibles para minimizar los residuos de brócoli y la huella de carbono en los hogares

Sustainable practices for minimizing broccoli waste and carbon footprint at household level

L. Rasines^{1,2*}, N. Castillejo^{1,2}, G. San Miguel³, E. Aguayo^{1,2}

¹Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Unidad de Calidad Alimentaria y Salud. Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar, 30202 Cartagena, Murcia, España.

³Escuela de Ingeniería Industrial, Grupo de Agroenergética, Universidad Politécnica de Madrid, 2806, Madrid, España.

*laura.rasines@upct.es

Resumen

La etapa de consumo se identifica como la principal fuente de desperdicio de alimentos en la cadena alimentaria, siendo las frutas y hortalizas los productos más afectados. Este estudio determina el escenario de conservación del brócoli con el menor desperdicio y huella de carbono (HC). Para ello, el brócoli se conservó embolsado o no, refrigerado a 5 °C ó 7 °C durante 34 días. El desperdicio de brócoli se calculó mediante evaluación sensorial, además se realizó una evaluación del ciclo de vida para conocer la huella de carbono desde el campo hasta el hogar. En conservaciones cortas, inferiores a 3 días, el brócoli no embolsado a 7 °C obtuvo la menor HC. Sin embargo, a partir de los 6 días, fue preferible almacenarlo embolsado a 5 °C, debido a la menor producción de desperdicio y, por consiguiente, menor desperdicio de recursos ambientales.

Palabras clave: Impacto ambiental, Calidad; Análisis de Ciclo de Vida; Consumidores; Evaluación sensorial.

Abstract

The consumption stage has been identified as the largest producer of food waste in the food supply chain, with fruit and vegetables being the most affected products. Therefore, this study aims to determine the broccoli storage scenario that results in the lowest food waste and carbon footprint (CF). Broccoli was stored bagged or unbagged at 5°C in the consumer's refrigerator for 34 days. Food waste at the household level was determined by sensory evaluation and a life cycle assessment was performed to evaluate the carbon footprint from cradle to grave for each storage scenario. For short storage periods (3 days), unbagged broccoli at 7 °C had the lowest CF. However, after 6 days, bagged broccoli at 5 °C was the best scenario. It produced less food waste and therefore less waste of resources.

Keywords: Environmental impact; Quality; Life cycle assessment; Consumers; Sensorial evaluation.

1. INTRODUCCIÓN

Un tercio de la comida se desperdicia a lo largo de la cadena de suministro, la cual representa alrededor de 1,3 billones de toneladas de comida al año, la mayor parte se produce en los hogares. Entre los diferentes grupos de alimentos, las frutas y hortalizas son aquellas con mayores tasas de desperdicio (1). Por ejemplo, en 2019 el 9 % de las emisiones de gases de efecto invernadero globales fueron debidas a la pérdida de recursos que ocasiona el desperdicio

alimentario (2). Con el propósito de evitar el desperdicio alimentario, la Unión Europea ha establecido el grupo de prevención de pérdidas y desperdicios alimentarios. Este grupo tiene como meta reducir para el año 2030 el 50% de los desperdicios generados en el comercio minorista y por los consumidores, además de disminuir las pérdidas y desperdicios alimentarios en toda la cadena de suministro (3). En este contexto, este trabajo tiene como objetivo determinar la huella de carbono (HC) derivada del desperdicio alimentario producido en el hogar, procedente de la reducción de la calidad del producto, según diferentes escenarios de conservación estudiados e identificar las etapas con mayor contribución al impacto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Simulación de diferentes escenarios de conservación

Para el estudio se utilizaron 35 kg de cabezas de brócoli (*Brassica oleracea var. italica* cv. Parthenon). Cada dos cabezas de brócoli ($731,7 \pm 68,1$ g) se almacenaron en un frigorífico doméstico a 5 °C ó 7°C, embolsadas o no en un plástico biodegradable (85 % ácido poliláctico - PLA y 15 % biopolímero de almidón) durante 34 días. Las cabezas de brócoli embolsadas se abrieron periódicamente (2 min) para simular las condiciones de almacenamiento domésticas. Se utilizaron tres réplicas (bolsas) por cada uno de los tratamientos evaluados.

2.2 Evaluación sensorial

Un panel de expertos formado por 30 miembros realizó en una sala de cata reglada, la evaluación sensorial de la calidad del brócoli. El análisis sensorial se basó en el grado de compacidad de la cabeza (1-compacto a 3-nada compacto) y en la evaluación de la senescencia (1-verde intenso, no senescente a 5-amarillo intenso, muy senescente). Además, se preguntó a los panelistas si tirarían el producto directamente a la basura (Tabla 1).

2.3 Evaluación de ambiental

El alcance de este estudio incluyó: i) la producción agrícola del brócoli en campo abierto, ii) la gestión del brócoli en la industria y la distribución a los supermercados iii) la venta a granel del brócoli en el supermercado y la distribución a los consumidores finales y iv) la refrigeración final y desperdicio generado en los hogares. Para la evaluación ambiental, además, se estudió el impacto ambiental del escenario base (día 0), donde se asume que no se refrigera el brócoli y no hay desperdicio. Adicionalmente, se evaluó el impacto ambiental de los siguientes escenarios: “Embolsado o no a 5 °C”, “embolsado o no a 7 °C”. La unidad funcional (UF) para este análisis fue de 1 kg de brócoli comprado por el consumidor, teniendo en cuenta las pérdidas y desperdicios ocasionados a lo largo de la cadena de suministro. El análisis de ciclo de vida se modelizó en Simapro v 3.8 y la metodología de impacto utilizada fue Environmental Footprint (EF 3.0 v1) dónde la única categoría que se evaluó fue el cambio climático. Para obtener el inventario de ciclo de vida (ICV) de los distintos escenarios, el ICV a día 0 se escaló en función de los porcentajes de desperdicios alimentarios obtenidos del análisis sensorial (Tabla 1), según recomendaciones de Ali et al. (2021) (4). Se añadieron los recursos asociados al desperdicio a través de la cadena de suministro.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la evaluación sensorial, las cabezas de brócoli fueron siempre rechazadas cuando el grado de compacidad y la senescencia alcanzaban 3 y 4 puntos, respectivamente. Según estos resultados, el brócoli no embolsado se tiraba a partir del día 6 mientras que el embolsado a partir del día 16.

Para el escenario base (día 0), la HC obtenida fue de 0,81 kg CO₂eq/UF. El cultivo de brócoli en campo fue la etapa que más contribuyó a la HC, un 88,1%, principalmente por la producción de fertilizantes, sus emisiones y la demanda de electricidad para el riego. La gestión del brócoli en la industria y supermercado tuvieron una contribución del 6,8 % y 5,1 % respectivamente. Para

ambas etapas, el transporte por carretera tuvo un gran peso en la HC. Para este escenario base, el impacto en el hogar fue insignificante (<0,1%) debido a los ahorros obtenidos por la gestión de residuos (reciclaje, biogás, e incineración con recuperación energética) y la no generación de desperdicio alimentario.

La Fig. 1 muestra el incremento de la HC a lo largo del estudio para los cuatro escenarios evaluados. Dentro de los primeros 3 días, no hubo desperdicio de brócoli en ninguno de los tratamientos estudiados. En comparación con el escenario base, la HC incrementó ligeramente debido al consumo eléctrico del refrigerador y de la bolsa, obteniendo una HC de 0,82 kg CO₂eq/UF para ambas temperaturas.

En el día 6, comenzó a generarse desperdicio de brócoli cuando éste no era embolsado, obteniendo una HC de 0,92 kg CO₂eq/UF (5 °C) y de 0,95 kg CO₂eq/UF (7° C). La demanda de brócoli para suplir la UF fue 1,45 kg para el brócoli no embolsado frente a los 1,16 kg del brócoli embolsado, ambos conservados a 7°C. Los resultados obtenidos apuntan que a partir del día 6, los residuos producidos en el hogar y la HC son mayores para el brócoli no embolsado (Figura 1). El uso de la bolsa redujo el desperdicio y, por lo tanto, la pérdida de recursos a lo largo de la cadena de suministro. Otros autores obtuvieron resultados similares, donde el impacto ambiental del envase era compensado por la extensión de la vida útil del producto alimenticio, contribuyendo en la reducción de la huella ambiental (5–7).

Al utilizar una temperatura menor (5 °C), se observó un incremento directo de la HC por un mayor consumo eléctrico. Sin embargo, este impacto fue compensado por la reducción en el desperdicio de brócoli y de recursos que son desperdiciados a lo largo del estudio(8,9). A partir del día 16, el impacto ambiental incrementó repentinamente en todos los escenarios. Para ese día, la menor HC se obtuvo para el brócoli embolsado a 5 °C (0,86 kg CO₂eq/UF) y la mayor HC fue para el brócoli sin embolsar a 7 °C (3,99 kg CO₂eq/UF), ya que generó más desperdicio y, por lo tanto, se requirió un mayor consumo de recursos para producir el brócoli que luego se desperdiciaba.

4. CONCLUSIONES

El brócoli embolsado y conservado a 5 °C mantuvo una mejor compacidad y vida útil, manteniendo la frescura (color) del producto, por lo que el consumidor lo desechó más tarde. Según la evaluación ambiental realizada, si se desea consumir el brócoli durante los primeros 3 días es suficiente con conservar el brócoli no embolsado a 7 °C, ya que la tasa de desperdicio es nula y las emisiones de CO₂eq son menores. En cambio, si se prevén largos tiempos de conservación frigorífica (>6 días) es preferible embolsar el brócoli y conservarlo a 5 °C, lo cual reduce el desperdicio alimentario y, en consecuencia, disminuye la pérdida de recursos ambientales.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España - Agencia Nacional de Investigación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) y por "ERDF A way of making Europe", de la "Unión Europea" [RTI2018-099139-B-C21]. Laura Rasines agradece el apoyo financiero de MCIN/AEI y de la beca "ESF Investing in your future" [PRE 2019- 090573].

6. REFERENCIAS

1. FAO. The state of food and agriculture. Moving forward on food loss and waste reduction [Internet]. Rome; 2019. 1–439 p. Available from: <https://doi.org/10.4060/CA6030EN>
2. UNEP. Food Waste Index Report 2021. Nairobi. 2021. 100 p. ISBN No: 978-92-807-3868-1
3. European Commission. European Food Loss and Waste Prevention Hub [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 31]. Available from: https://ec.europa.eu/food/safety/food_waste/eu-food-loss-waste-prevention-hub/
4. Ali A, Xia C, Ouattara NB, Mahmood I, Faisal M. Economic and environmental consequences' of postharvest

loss across food supply Chain in the developing countries. J Clean Prod [Internet]. 2021;323:129146. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129146>

5. Lorite GS, Rocha JM, Miilumaäki N, Saavalainen P, Selkälä T, Morales-Cid G, et al. LWT - Food Science and Technology Evaluation of physicochemical / microbial properties and life cycle assessment (LCA) of PLA-based nanocomposite active packaging. Food Sci Technol [Internet]. 2017;75:305–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.004>
6. Céline M, Valérie G, Karine G, Sandrine C, Nathalie G, Stéphane G, et al. Consumer behaviour in the prediction of postharvest losses reduction for fresh strawberries packed in modified atmosphere packaging. Postharvest Biol Technol [Internet] 2020;163: 111119. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111119>
7. Casson A, Giovenzana V, Frigerio V, Zambelli M, Beghi R, Pampuri A, et al. Beyond the eco-design of case-ready beef packaging: The relationship between food waste and shelf-life as a key element in life cycle assessment. Food Packag Shelf Life [Internet]. 2022;34:100943. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100943>
8. Brown T, Hipps NA, Easteal S, Parry A, Evans JA. Reducing domestic food waste by lowering home refrigerator temperatures. Int J Refrig [Internet]. 2014;40:246–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2013.11.021>
9. Holsteijn F van, Kemna R. Minimizing food waste by improving storage conditions in household refrigeration. Resour Conserv Recycl [Internet]. 2018;128:25–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.09.012>

Tabla 1. Desperdicio de brócoli (%) en el hogar según condiciones de conservación estudiadas.

Condiciones de conservación	Días										
	0	3	6	8	10	13	16	20	24	29	34
Embolsado 5° C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	20.0%	40.0%	86.7%
Embolsado 7° C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	6.7%	40.0%	70.0%	86.7%	99.99%
No embolsado 5° C	0.0%	0.0%	13.3%	23.3%	30.0%	33.3%	36.7%	53.3%	86.7%	93.3%	99.99%
No embolsado 7° C	0.0%	0.0%	20.0%	30.0%	36.7%	60.0%	80.0%	83.3%	93.3%	99.99%	99.99%

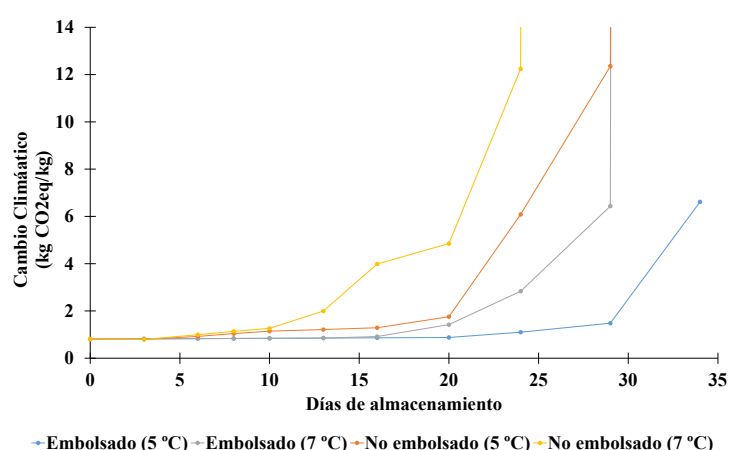


Figura 1. Huella de carbono por unidad funcional (1 kg de brócoli usado en el hogar) según condiciones de conservación estudiadas.

Efecto de la luz UV-B como estrés abiótico para potenciar la capacidad antioxidante de subproductos de tomate

Effect of UV-B light as an abiotic stress to enhance the antioxidant capacity of tomato by-products

L. Mozafari^{1*}, L. Martínez-Zamora^{1,2}, Marina Cano-Lamadrid¹, F. Artés-Hernández¹

¹ Postharvest and Refrigeration Group, Department of Agricultural Engineering & Institute of Plant Biotechnology, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena, Murcia, Spain.

² Department of Food Technology, Nutrition, and Food Science. Faculty of Veterinary Sciences. University of Murcia, 30100 Espinardo, Murcia, Spain.

* laleh.mozafari@edu.upct.es

Resumen

Los subproductos del procesamiento de tomate (pieles y semillas) son muy ricos en compuestos bioactivos. Por ello, el objetivo fue incrementar las propiedades funcionales de los mismos mediante la aplicación de radiación ultravioleta B (UV-B) (0, 5, y 15 kJ m⁻²) como estrés abiótico postcosecha para estudiar la influencia sobre la capacidad antioxidante total (TAC). La TAC se evaluó por los métodos DPPH, ABTS y FRAP durante 2 días a 15°C tras la radiación UV-B (0, 4, 8, 24, 28, 36, 48 h). La TAC de las muestras aumentó en las muestras UVB5 en comparación con el control sin tratamiento UV-B. El TAC de las muestras aumentó en las muestras UVB5 en comparación con el grupo control (sin tratamiento UV-B). En conclusión, la funcionalidad de estas muestras aumentó principalmente tras el estrés por UV-B y se mantuvo durante 24 h, cuando se debería realizar la extracción de los compuestos bioactivos en estos subproductos. Así pues, la radiación UV-B es una tecnología eficaz para la estimulación de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, en beneficio de los consumidores que demandan una dieta saludable.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*; capacidad antioxidante total; ultravioleta; compuestos bioactivos; revalorización.

Abstract

Tomato processing by-products (peels and seeds) are very rich in bioactive compounds. Therefore, the objective of this work was to increase their functional properties by applying ultraviolet B radiation (UV-B) (0, 5, and 15 kJ m⁻²) as a postharvest abiotic stress to study the influence on the total antioxidant capacity (TAC). TAC was assessed by DPPH, ABTS and FRAP methods during 2 days at 15°C after treatment (0, 4, 8, 24, 28, 36, 48 h). TAC of UVB5 samples increased regarding control without UV-B treatment. In conclusion, the functionality of these samples was enhanced mainly after UV-B stress and was maintained throughout 24 h, when the extraction of the bioactive compounds in these by-products should be performed. Thus UV-B radiation is an effective technology for the stimulation of bioactive compounds with antioxidant properties, for the benefit of consumers demanding a healthy diet.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; total antioxidant activity; ultraviolet; bioactive compounds; revalorization.

1. INTRODUCTION

Tomato, *Solanum lycopersicum*, is the second most important vegetable crop worldwide and is a key component of the Mediterranean diet. Its consumption is directly associated with reducing the risk of inflammatory processes, different chronic diseases, and carcinogenesis due to the high content of bioactive compounds as carotenoids and phenolics. Over 130 million tons tomato are processed every year, and approximately eight million tons represent the waste generated as estimated by the World Processing Tomato Council (1).

The solid residue remaining after the industrial processing of tomatoes (i.e., tomato pomace, consists of large amounts of tomato peels and seeds) currently find use as animal feed and fertilizers or are sent to landfill(2). However, it is still rich in highly beneficial phytochemicals such as carotenoids, phenolic compounds, and vitamins that can be revalorized. Many epidemiological data support a correlation between carotenoids, especially lycopene intake, and several nutritional and health benefits, including the prevention of carcinogenesis and cardiovascular diseases(3). Current trends in the fruit and vegetable sector are focused on finding novel approaches to raise the concentration of bioactive chemicals. Light is one of the methods that have been employed in this field to enhance these bioactive chemicals using abiotic stresses. It plays a significant role in the growth of plants and the manufacture of primary and secondary metabolites, including carotenoids, flavonoids, glucosinolates, and phenolic compound. Applying abiotic stresses in non-visible spectral regions, like UV-B (280–315 nm), is said to have a hermetic effect at low doses, stimulating the metabolite pathways positively. However, at moderate to high UV doses, plant tissues may exhibit a negative response (4).

In fact, the primary UV-B receptors that control carotenoid production are UV RESPONSE LOCUS 8 (UVR8). Consequently, it has been demonstrated that UV-B increases the amounts of bell peppers' primary antioxidant components, carotenoids, and flavonoids. Thus, UV can be used to stimulate the expression of antioxidant enzymes, increasing the creation of several compounds, including carotenoids, phenolic acids, flavonoids, and vitamins(5).

The objective of the present work was to study the use of UV-B light as promotor of the synthesis of phytochemicals in tomato by-products obtained during the production of grated tomato.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials, reagents, and instrumentation

Valkirias tomato by-products were obtained from Bonnysa Group (Alicante, Spain). Then the samples received a total effective dose inside of tray of 5 and 15 kJ m⁻² UV-B. The radiation chamber consisted of a reflective stainless-steel chamber equipped with 6 UV-B unfiltered emitting lamps (TL 40W/01 RS; Philips, Eindhoven, The Netherlands). The applied UV-B intensity was calculated as the mean of 20 readings with a LP 471 UVB radiometer (Delta OHM, Italy): 8.26 ± 0.32 W m⁻². The antioxidant capacity of treated samples was monitored after 0, 4, 8, 24, 28, 36, and 48 hours from the treatment at 15 °C.

2.2 Methodology

For the extraction of phytochemical compounds, 25 mg of lyophilized tomato by-product discards mixed with 3 mL of MeOH 80 %. Then samples were shaken for 1 h in darkness at 4°C and then centrifuged at 3220 g for 10 min. The supernatant was collected and analyzed(4). TAC was analyzed using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing ability power), and ABTS+(2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) assays. DPPH assay was performed by adding 0.194 mL of DPPH solution to 0.021 mL of extract. After 30 min incubation in darkness, absorbance was measured at 515 nm. Then, 0.198 mL of FRAP solution was added to 0.006 mL of extract, and the mixture was incubated for 30 min in darkness, with TAC measured

by changes in absorbance at 593 nm. The ABTS assay was performed by adding 0.2 mL of the activated ABTS⁺ solution to 0.011 mL of extract. TAC was assessed by changes in absorbance at 414 nm after 20 min under darkness conditions(5). The microplate reader (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland) was used for all the measurements and TAC was expressed as g of Trolox Equivalents (TE) kg⁻¹.

2.3 Statistical Analysis

The experiment was subjected to analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Plus software (v. 5.1. Statpoint Technologies. Inc. Warrenton. VA. USA). Statistical significance was assessed at the level $p < 0.05$, and Tukey's multiple range test was used to separate means.

3. RESULTS AND DISCUSION

From a general point of view, the TAC of the samples increased in most of the storage times with UV-B 5 and UV-B15 in comparison with control group, and this increase was the maximum level after 24 hours storage in UVB5 treatment in DPPH and FRAP test, showing 2-fold higher TAC compared to CTRL (DPPH). However, UVB 15 treatment showed more content in 8 and 48 hours after storage time in ABTS test. In this sense, by applying UV-B treatments, the TAC increases, which is a direct reaction to the administration of abiotic postharvest stressors like radiation. When exposed to UV light, phenolics act as absorber chemicals, accumulating in the vacuoles of epidermal cells and reducing the amount of radiation that reaches deeper cell layers. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activation following abiotic stressors brought on by reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules has been connected to the manufacture of phenols. Due to transcriptome alterations, UV-B photoreceptors, of which UVR8 is the primary photoreceptor for UV-B, initiate all these processes. UVR8's interaction with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1) has made it possible for UVR8 to dissociate into a monomer. This contact transmits the UV-B signal to the subsequent pathway components in this manner(5).

4. CONCLUSIONS

Our results demonstrated that the application of UV-B light can increase the bioactive compounds of tomato by-products related to the TAC. This can be an interesting technological tool for revalorization of food losses and waste, by enhancing the concentration of health promoting compounds in food by-products to get high value extracts.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge grant PID2021-123857OB-I00, funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and FEDER, and grant PRTR-C17.I1 AGROALNEXT, supported by MICIU with funding from EU NextGenerationEU and by Fundación Séneca with funding from CARM. LMZ thanks Margarita Salas postdoctoral contract at UM funded by the EU NextGenerationEU.

6. REFERENCES

1. Trombino S, Cassano R, Procopio D, Di Gioia ML, Barone E. Valorization of tomato waste as a source of carotenoids. *Molecules*. 2021;26(16):5062.
2. Kaur G, Uisan K, Ong KL, Lin CSK. Recent trends in green and sustainable chemistry & waste valorisation: rethinking plastics in a circular economy. *Current opinion in green and sustainable chemistry*. 2018;9:30-9.
3. Strati I, Oreopoulou V. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products—a review. *Food research international*. 2014;65:311-21.
4. Martínez-Zamora L, Castillejo N, Artés-Hernández F. Postharvest UV-B and UV-C radiation enhanced the biosynthesis of glucosinolates and isothiocyanates in Brassicaceae sprouts. *Postharvest Biology and Technology*. 2021;181:111650.

5. Martínez-Zamora L, Castillejo N, Artés-Hernández F. UV-B radiation as abiotic elicitor to enhance phytochemicals and development of red cabbage sprouts. *Horticulturae*. 2021;7(12):567.

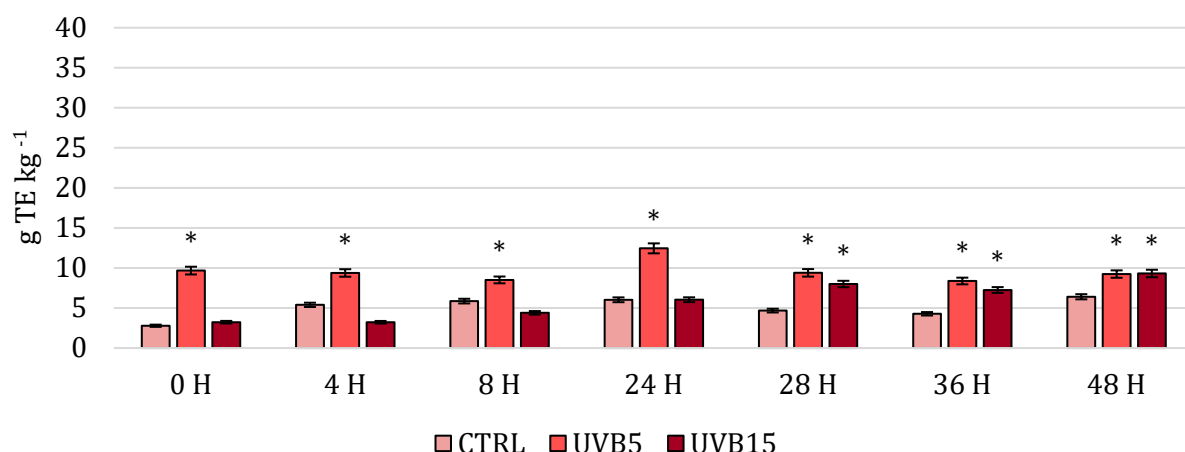


Figure 1. Total antioxidant capacity (g TE kg⁻¹) measured by DPPH test of tomato by-products under studied treatments and evolution during 48 h. * denotes significant differences compared to CTRL.

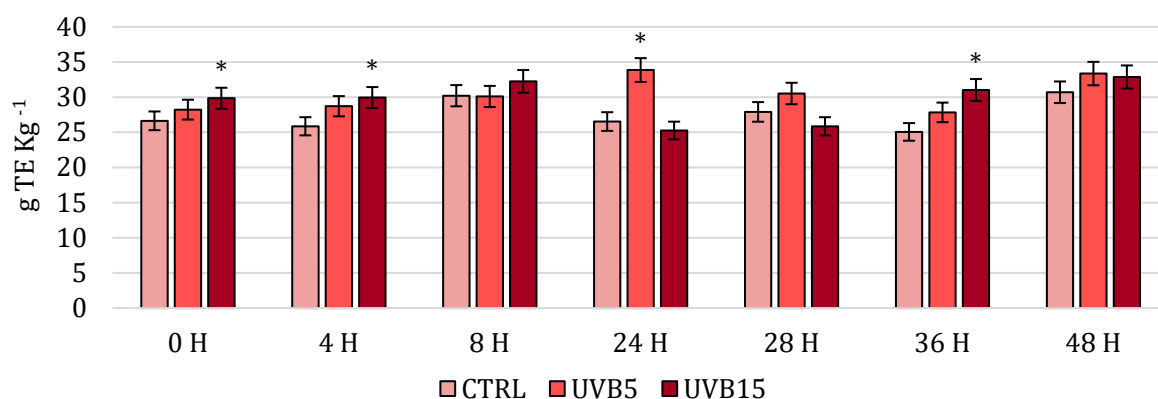


Figure 2. Total antioxidant capacity measured by FRAP test of tomato by-products under studied treatments and evolution during 48 h. * denotes significant differences compared to CTRL.

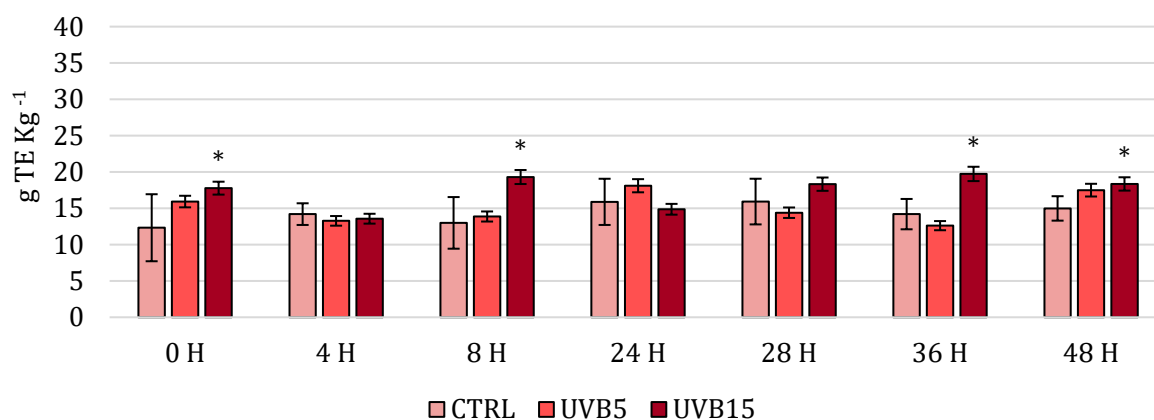


Figure 3. Total antioxidant capacity measured by ABTS test of tomato by-products under studied treatments and evolution during 48 h. * denotes significant differences compared to CTRL.

Análisis de los parámetros de inactivación de *Lactobacillus* spp. mediante aplicación de tratamiento por altas presiones hidrostáticas

Analysis of the inactivation parameters of *Lactobacillus* spp. by applying high-hydrostatic pressure treatment

M.T. Gómez-Hernández*, A. López-Gómez, G.B. Martínez-Hernández

Grupo de Ingeniería del Frío y de la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*migueltoomas.gomez@upct.es

Resumen

Por su prometedor papel en la industria alimentaria y en el ámbito de la salud humana, la investigación sobre los efectos positivos de los microorganismos probióticos no viables (paraprobióticos) y sobre sus métodos de obtención está adquiriendo cada vez más interés. Diferentes métodos de inactivación se han estudiado a lo largo de los años y se emplean hoy en día, siendo el más habitual el tratamiento térmico. En este ensayo analizamos el proceso de inactivación de dos cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus* mediante la aplicación de altas presiones hidrostáticas. El empleo de un tratamiento de presiones de 500 MPa sobre ambos microorganismos probióticos consiguió su inactivación en un periodo moderado de tiempo (20 min), y los parámetros de esta inactivación pueden optimizarse de cara a escalar el procedimiento para la producción industrial de estos paraprobióticos.

Palabras clave: paraprobióticos; bacterias ácido-lácticas; análisis de supervivencia, respuesta a estrés por presión.

Abstract

Due to their promising role in both the food industry and human health, research on the positive effects of non-viable probiotic microorganisms (paraprobiotics) and their methods of obtention is acquiring a growing interest. Several inactivation methodologies have been studied over the years and are currently in use, thermal treatments being the most common among them. In this study, we assess the inactivation process of two strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. acidophilus* cultured in fermenting conditions via the application of high-hydrostatic pressure. The utilization of pressures of 500 MPa on both probiotic strains achieved their inactivation within a moderate period (20 min), and the parameters of this inactivation method may be befitting for optimization upon escalation to industrial production of these non-viable microorganisms.

Keywords: paraprobiotics, lactic acid bacteria, survival analysis, pressure-stress response.

1. INTRODUCCIÓN

Aunque el concepto de probiótico se refiere a un microorganismo vivo que cuando es consumido en cantidades adecuadas confiere un beneficio en la salud (como las bacterias ácido-lácticas del género *Lactobacillus* spp.) (1), los mecanismos con los que interactúan los probióticos con la flora intestinal no son perfectamente conocidos a pesar de haber sido ampliamente estudiados (2), y es posible que incluso no requieran de viabilidad. En consecuencia, una hipótesis alternativa de estudio es que los efectos positivos sobre la salud también pueden observarse con

el consumo de microorganismos no viables, ya sean células intactas o lisadas, llamados paraprobióticos (3). La no viabilidad implica una interacción menor con otros componentes, por lo que pueden ser más seguros a la hora de ser consumidos ya que se reducen los riesgos de efectos adversos, lo que supone una ventaja a nivel alimentario y clínico (4), y a la vez pueden conservarse con condiciones menos estrictas manteniendo a la par su seguridad y estabilidad, lo que supone una ventaja a nivel tecnológico e industrial (5). Sin embargo, la obtención de los paraprobióticos implica la selección de un tratamiento de inactivación que permita preservar los efectos beneficiosos (6). El tratamiento térmico es el método de inactivación convencional en la industria alimentaria, pero su aplicación puede causar alteraciones en las características fisicoquímicas y organolépticas en ciertos productos (7). Un tratamiento alternativo es mediante la aplicación de altas presiones hidrostáticas (HPP, *high-hydrostatic pressure*) de entre 100 y 1200 MPa (8), lo que provoca inactivación en los microorganismos al causar daños en la membrana y desnaturalización proteica entre otros efectos; no obstante, la tolerancia a estas presiones varía según la especie y cepa del microorganismo (6,8). Por tanto, es importante definir y optimizar los parámetros de inactivación. En consecuencia, el objetivo del presente estudio es determinar las condiciones de inactivación mediante altas presiones hidrostáticas sobre dos cepas de bacterias ácido-lácticas comerciales crecidas en condiciones de fermentación, con el fin de optimizar la intensidad y la duración del tratamiento de inactivación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de las muestras

Se emplearon cultivos liofilizados de los microorganismos probióticos *Lactocaseibacillus rhamnosus* (en adelante LR), y *Lactobacillus acidophilus* (en adelante LA). La activación de los inóculos se realizó introduciendo un inóculo de 0,5 g de liofilizado en tubos de ensayo con caldo MRS (Condalab, España), que fueron incubados durante 20 h en estufa a 37 °C. Cada uno de los inóculos activados fue incorporado en botellas de 500 mL de leche desnatada en polvo obtenida en supermercado local (Cartagena, España), previamente reconstituida al 8% en peso en agua destilada y esterilizada mediante autoclave a 121 °C y presión de 1 bar por encima de la presión atmosférica durante 5 min. Las botellas inoculadas se incubaron durante 20 h a 37 °C en un agitador orbital (IVYMEN, Comecta, Barcelona, España) programado a 160 rpm.

2.2 Tratamiento de inactivación por altas presiones hidrostáticas (HPP)

Los tratamientos de inactivación por HPP se llevaron a cabo en un equipo a escala piloto (Stansted Fluid Powder Ltd, Reino Unido) del Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la Universidad Politécnica de Cartagena. En un ensayo, se distribuyeron alícuotas de 80 mL de cultivo de LR en envases plásticos estériles tipo *pouch*, de uso alimentario y comercial, en condiciones de esterilidad, luego sellados en vacío por duplicado. Se aplicaron tratamientos de diferentes presiones (300, 400 y 500 MPa) durante distintos intervalos de tiempo (½–15 min) a temperatura de 25 °C. En otro ensayo, alícuotas de 100 mL de cultivos de LR y de LA se introdujeron en bolsas estériles de polietileno tipo Stomacher™ (Seward, Reino Unido), termoselladas en condiciones de esterilidad y evitando la introducción de aire. Se empaquetaron 5 bolsas de cultivo sellándolas en una bolsa de vacío, que posteriormente fueron selladas en vacío en dos bolsas adicionales. Se aplicaron tratamientos de diferentes presiones (400 y 500 MPa) durante diferentes intervalos de tiempo (10, 15 y 20 min) a temperatura de 25 °C. Tras la aplicación de los tratamientos, se extrajeron muestras para su siembra en placas de MRS agar, incubadas durante 48 h a 37 °C.

2.3 Análisis estadístico

Con el fin de conocer la influencia del tiempo de tratamiento y de la presión sobre el recuento de bacterias ácido-lácticas, se sometió a los datos a un análisis de varianza (ANOVA) con

el uso de las herramientas Statgraphics Centurion 15 y Microsoft Excel. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se separaron mediante el test LSD (*least significant difference*) de Fisher.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra el efecto sobre la viabilidad de *L. rhamnosus* de la aplicación de altas presiones. Sobre una concentración inicial de 9 log UFC/mL, a 300 MPa apenas se observó una reducción máxima de 4 unidades logarítmicas tras 15 minutos de tratamiento. La aplicación de presiones de 400 MPa tuvo un efecto de inactivación más evidente, pero no se alcanzó una reducción notoria (6,5 ciclos log) hasta una exposición de 10 min. El empleo de presiones de 500 MPa sí consiguió reducir el recuento de células viables en 7 ciclos log tras 2 min de tratamiento, pero no se consiguió una inactivación completa. Estos resultados son consistentes con los descritos por Ananta & Knorr (9), quienes reportaron que presiones de 400 MPa no tenían un efecto letal sobre *L. rhamnosus* ATCC 53103 pero presiones más elevadas sí llevaban a disminución del conteo de células viables en más de 7 ciclos log.

En la Figura 2 se recogen los efectos sobre la viabilidad de LR y de LA de la aplicación de altas presiones de 400 MPa y 500 MPa en periodos más prolongados. Si bien la aplicación de presiones de 400 MPa durante 20 min logra una inactivación completa sobre *L. acidophilus*, no es el caso para *L. rhamnosus* cuya tasa de letalidad muestra una estabilización de la población superviviente, lo que sugiere que cierta parte de la población bacteriana era más resistente al efecto de las presiones; un resultado que concuerda con lo descrito por Ananta & Knorr (9). Sin embargo, el empleo de presiones de 500 MPa durante 20 min muestra una alta letalidad para ambas cepas, cuyo conteo de supervivientes fue inferior a 10 UFC/mL. Trujillo *et al.* (10) reportaron en su revisión que las bacterias grampositivas requieren un tratamiento de 500–600 MPa a 25 °C durante 10 min para lograr la inactivación, lo que resulta consistente con los datos observados en este estudio.

4. CONCLUSIONES

A tenor de los resultados obtenidos, es posible concluir que los lactobacilos seleccionados poseen cierta tolerancia al estrés por altas presiones hidrostáticas, pues a escala de laboratorio no se ha logrado su inactivación completa hasta la aplicación de presiones de 500 MPa durante 20 min. Presiones más elevadas pueden acortar el tiempo de inactivación, pero ha de considerarse que a su vez no debe producirse alteración sobre la integridad del medio de fermentación empleado. En cualquier caso, es importante notar que, dada la necesidad de equipamiento especializado para la inactivación por altas presiones hidrostáticas, los resultados obtenidos en el presente ensayo han de ser validados en pruebas más específicas y con volúmenes de trabajo más próximos a los empleados en la producción industrial para optimizar y rentabilizar el procedimiento de obtención de microorganismos paraprobióticos.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la empresa Martínez Nieto, S.A. su apoyo y financiación a través del Proyecto CDTI IDI-20211211, donde se enmarcan estas investigaciones.

6. REFERENCIAS

1. Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. Clin Infect Dis. 2015;60(Suppl 2):S98–107.
2. Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, et al. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. Trends Microbiol [Internet]. 2021;29(8):667–85.
3. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). Genes Nutr. 2011;6(3):261–74.
4. Oggioni MR, Pozzi G, Galieni P, Valensin PE, Bigazzi C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis [2]. J Clin Microbiol. 1998;36(1):325–6.

5. Barros CP, Guimarães JT, Esmerino EA, Duarte MCK, Silva MC, Silva R, et al. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Curr Opin Food Sci.* 2020;32:1–8.
6. de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant'Ana AS. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2016;58:96–114.
7. Gholamhosseinpour A, Hashemi SMB, Raoufi Jahromi L, Sourki AH. Conventional heating, ultrasound and microwave treatments of milk: Fermentation efficiency and biological activities. *Int Dairy J.* 2020;110.
8. De Angelis M, Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics.* 2004;4(1):106–22.
9. Ananta E, Knorr D. Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiol* [Internet]. 2009;26(5):542–6.
10. Trujillo AJ, Capellas M, Saldo J, Gervilla R, Guamis B. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products. *High Press Res.* 2002;22(3–4):619–26.

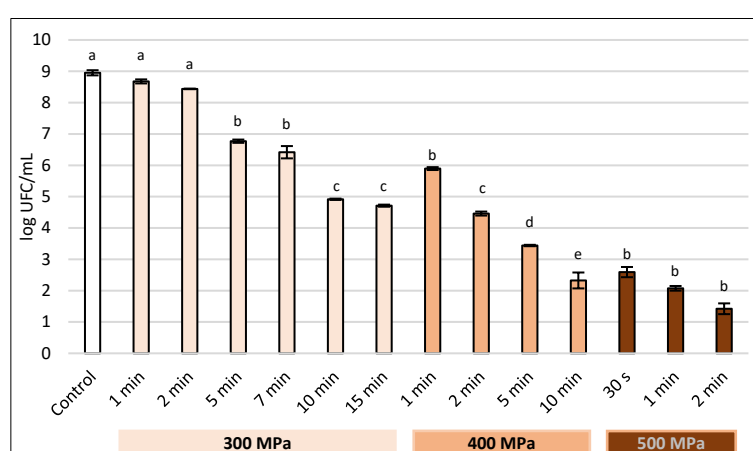


Figura 1. Inactivación de *L. rhamnosus* (en envases tipo *pouch*) mediante altas presiones hidrostáticas de 300 MPa, 400 MPa y 500 MPa. Los tiempos de tratamiento fueron variables (½–15 min). La barra de error representa la desviación estándar ($n=3 \pm SD$). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el mismo tratamiento a lo largo del tiempo.

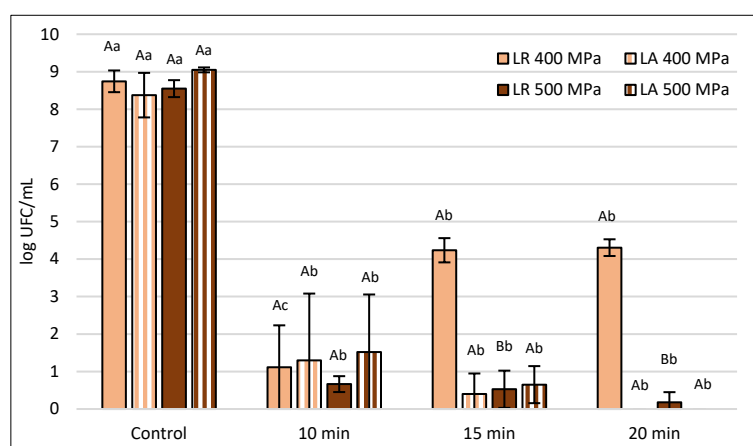


Figura 2. Inactivación por altas presiones hidrostáticas de *L. rhamnosus* (barras continuas) y de *L. acidophilus* (barras rayadas) a 400 MPa (■) y 500 MPa (■). La barra de error representa la desviación estándar ($n=5 \pm SD$). Para cada microorganismo, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos de igual duración a diferente presión; letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el mismo tratamiento a lo largo del tiempo.

Evolución de características físicas y químicas en el almacenamiento de ñampín morado (*Dioscorea trifida*)

Physical and chemical characteristics evolution along purple yampee (*Dioscorea trifida*) storage

S.V. Medina-López^{1,2*}, J. P. Fernández-Trujillo², M. S. Hernández-Gómez^{1,3}

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia AC. 26 #40-85, 111321, Bogotá D. C., Colombia.

² Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

³ Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI, Cl. 20 #5-44, La Candelaria, Bogotá, 110311, Colombia.

*sandraviviana.medina@edu.upct.es

Resumen

La utilización sostenible de especies de la agrobiodiversidad ha destacado como alternativa a un sistema alimentario resiliente, tomando como bandera especies locales ricas en nutrientes y fitoquímicos de interés nutraceuticos. Los ñames pertenecen a un género botánico de tubérculos que pueden ser útiles como fuentes de ingredientes bioactivos y compuestos funcionales para la industria alimentaria, a pesar del desconocimiento sobre su fisiología para un aprovechamiento extensivo. Una de las mayores problemáticas suele ser la pérdida de peso asociada al metabolismo respiratorio de los productos, por lo cual en este estudio se evaluó la intensidad respiratoria y la evolución del peso de tubérculos nativos de américa conocidos como “ñampines” en almacenamiento. Se observó una tendencia a perder mayor peso, con una mayor intensidad respiratoria bajo las condiciones de menor humedad relativa, por lo cual es preciso valores superiores en esta variable, además de modular otras condiciones de almacenamiento a 24 °C.

Palabras clave: Tubérculo; ñame; postcosecha; tratamientos de bajo coste.

Abstract

The sustainable use of agrobiodiversity species has been highlighted as an alternative to a resilient food system, using local species rich in nutrients and phytochemicals of nutraceutical interest. Yams belong to a botanical genus of tubers that can be useful as sources of bioactive ingredients and functional compounds for the food industry, despite the lack of knowledge about their physiology for extensive use. One of the major problems is usually the weight loss associated with the respiratory metabolism of the products, which is why in this study the respiratory intensity of the products was evaluated. The respiratory intensity and weight evolution of native American tubers known as "yampee" in storage were evaluated in this study. Tubers tended to lose more weight, with greater respiratory intensity under conditions of lower relative humidity, so higher values for this variable are needed, in addition to modulating other storage conditions at 24 °C.

Keywords: Tuber; yam; postharvest; low-cost technologies.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los pilares del desarrollo sostenible para muchos autores radica en el uso de especies locales para promover la conservación de la biodiversidad y a su vez, favorecer una mayor oferta

de alimentos que aporten a dietas de mayor calidad nutricional para alimentar a la creciente población mundial en el actual escenario de cambio climático [1,2].

Entre algunas de las fuentes de calorías y además, de compuestos bioactivos, se encuentran muchas especies infrautilizadas de órganos subterráneos de almacenamiento. Un taxón de especial relevancia es el de los "ñames verdaderos", *Dioscorea* spp., con una única especie comestible de distribución neotropical originaria de las Américas: *Dioscorea trifida* L. f., conocida como ñampín (cush-cush yam o yampee) [3–6]. Una de las desventajas en la utilización e industrialización de estas especies, sin embargo, es el desconocimiento sobre sus aptitudes tecnológicas, e incluso su fisiología en la postcosecha para comercialización en fresco. La mayoría de los productores (68%) comercializa los ñames en el lote de producción, para evitar asumir, entre otros, las pérdidas financieras que derivan del decremento en el peso del tubérculo, que por su alta humedad puede presentar pérdidas postcosecha hasta del 40% [7]. Para algunas especies de *Dioscorea* como el ñampín, las condiciones de almacenamiento para disminuir estas pérdidas no se han estandarizado bajo estudios recientes que exhiban el comportamiento postcosecha del tubérculo. En este estudio se evaluó la variación en la actividad respiratoria y la correspondiente pérdida de peso de los tubérculos durante 25 días de muestreo, en condiciones de almacenamiento controladas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tubérculos de ñampín morado (*D. trifida*) producidos la región de los Montes de María, se empaquetaron en cajas de cartón y enviaron a Bogotá para su posterior análisis y tratamiento. El hipoclorito de sodio, el cloruro de calcio de calidad alimentaria, el aceite de sésamo y el ácido cítrico se adquirieron a distribuidores comerciales locales. Una vez recibidos, los tubérculos se lavaron, cepillaron manualmente para reducir la tensión mecánica y sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio.

2.1 Almacenamiento

Los tubérculos fueron almacenados a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en dos condiciones de humedad relativa (HR; 70 y 90% - cámaras climáticas Forma® 3911, Thermo Scientific) para observar su comportamiento en función de las siguientes determinaciones fisicoquímicas: actividad respiratoria y pérdida de peso. Otras condiciones de almacenamiento como la atmósfera y la luz no fueron manipuladas entre los tratamientos.

2.2 Análisis

La pérdida de peso se determinó mediante un pesaje diario de 30 tubérculos de ñampín almacenados durante 25 días sin envases, en cantidades de 2 kg por bandeja metálica, que previamente habían sido esterilizadas. Para estas mismas unidades experimentales se realizó una medida de la actividad respiratoria a través de un analizador con sensores infrarrojos de CO_2 (Vernier CO2BTA, OR, USA). El volumen de los tubérculos fue tomado previo a cada medida de respiración, que se estandarizó tras un monitoreo en el equipo por 24 h, a 10 min de confinamiento individual, previo a la toma de datos de CO_2 (ppm) cada 0,25 segundos durante 15 min, tras los cuales el analizador LabQuest ajustó un modelo lineal de la producción de CO_2 , utilizado para estimar la tasa respiratoria, expresada en $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de CO_2 .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa respiratoria que presentaron los tubérculos durante el almacenamiento fue similar bajo ambas humedades relativas y, salvo al principio y final del muestreo, con niveles inferiores a los $5\text{--}25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de CO_2 como ha sido descrito para otros tubérculos del género *Dioscorea* [8]. Bajo las condiciones medidas, ambas humedades mantuvieron actividades respiratorias similares

hasta el último punto medido, a pesar de observarse una tendencia de la HR de 90% a presentar menores magnitudes en varios puntos. En esta medida, al reducir la tasa respiratoria, se podría modular el comportamiento fisiológico del tubérculo de manera que no se presentara una alta degradación de los carbohidratos de almacenamiento típicamente deseables para el consumo como factores de calidad al momento del consumo, como es el almidón para chips freídos, cocción del tubérculo o la mera extracción de polvos o harinas, y podría sugerirse almacenar los tubérculos a mayor HR. Asimismo, para este tipo de productos se evitaría el desarrollo de desórdenes como el dulzor senescente que afectaría tanto su calidad organoléptica como sensorial, al disminuir este recambio natural del metabolismo respiratorio que se ve afectado, como se observa en la figura 2 por estas condiciones de almacenamiento. Durante el período de almacenamiento, que superó los 10 días para ambas condiciones, no se superó el 10% de pérdida de peso en los tubérculos (siendo el valor máximo menor al 7%), indicando la viabilidad de la comercialización del tubérculo en condiciones preferiblemente de alta humedad, con las condiciones adecuadas de higiene para conservar la inocuidad y calidad del producto.

4. CONCLUSIONES

Los tubérculos de ñampín debidamente preacondicionados pueden ser conservados a 24°C y preferentemente a 90% HR con pérdidas de peso inferiores al 5% tras 5 días, y con tasas respiratorias bajas especialmente tras el primer día e inferiores a 10 mL·kg⁻¹·h⁻¹ de CO₂.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del personal del Laboratorio de Calidad y Poscosecha de la Facultad de Ciencias Agrarias e ICTA de la Universidad Nacional de Colombia- sede Bogotá por su apoyo durante el desarrollo del proyecto, incluyendo profesores, colegas asociados y allegados.

6. REFERENCIAS

1. Dwivedi, S.L.; Lammerts van Bueren, E.T.; Ceccarelli, S.; Grando, S.; Upadhyaya, H.D.; Ortiz, R. Diversifying food systems in the pursuit of sustainable food production and healthy diets. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 842–856, doi:10.1016/j.tplants.2017.06.011.
2. FAO Future Smart Food *Rediscovering hidden treasures of neglected and underutilized species for Zero Hunger in Asia*; Li, X., Siddique, K.H.M., Eds.; 2018; ISBN 9789251304952.
3. González Vega, M.E. El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultiv. Trop.* **2012**, *33*, 5–15.
4. Cumo, C. *Encyclopedia of Cultivated Plants. From Acacia to Zinnia*; ABC-CLIO, 2013; ISBN 2012031374.
5. de Castro, A.P.; Fraxe, T. de J.P.; dos Santos Pereira, H.; Kinupp, V.F. Etnobotânica das variedades locais do cará (*Dioscorea* spp.) cultivados em comunidades no município de Caapiranga, estado do Amazonas. *Acta Bot. Brasilica* **2012**, *26*, 658–667, doi:10.1590/S0102-33062012000300015.
6. Nascimento, W.; Siqueira, M.; Ferreira, A.; Ming, L.; Peroni, N.; Veasey, E. Distribution, management and diversity of the endangered Amerindian yam (*Dioscorea trifida* L.). *Brazilian J. Biol.* **2015**, *75*, 104–113, doi:10.1590/1519-6984.08313.
7. Martínez Reina, A. M.; Tordesilla Zumaqué, L.; Grandett Martínez, L.M.; Pérez Cantero, S.P.; Regino Hernández, S.M.; Luna Castellanos, L.L. Caracterización socioeconómica y tecnológica del cultivo de ñame (*Dioscorea* spp.) en la región Caribe colombiana. *Avances en investigación Agropecuaria* **2021**, *25*, 6–30. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83766825002>
8. Ravi, V.; Aked, J. Review on tropical root and tuber crops. II. Physiological disorders in freshly stored roots and tubers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1996**, *36*, 711–731. <https://doi.org/10.1080/10408399609527745>

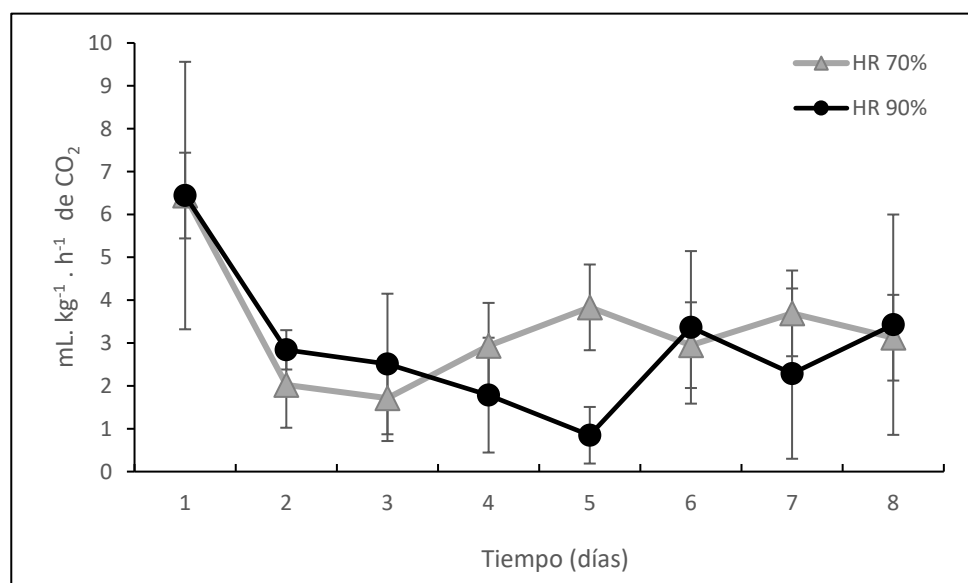


Figura 3. Actividad respiratoria (media ± desviación estándar, n=3) de tubérculos de ñame almacenados a 24±1°C bajo dos condiciones de humedad relativa (HR), 70% y 90 %.

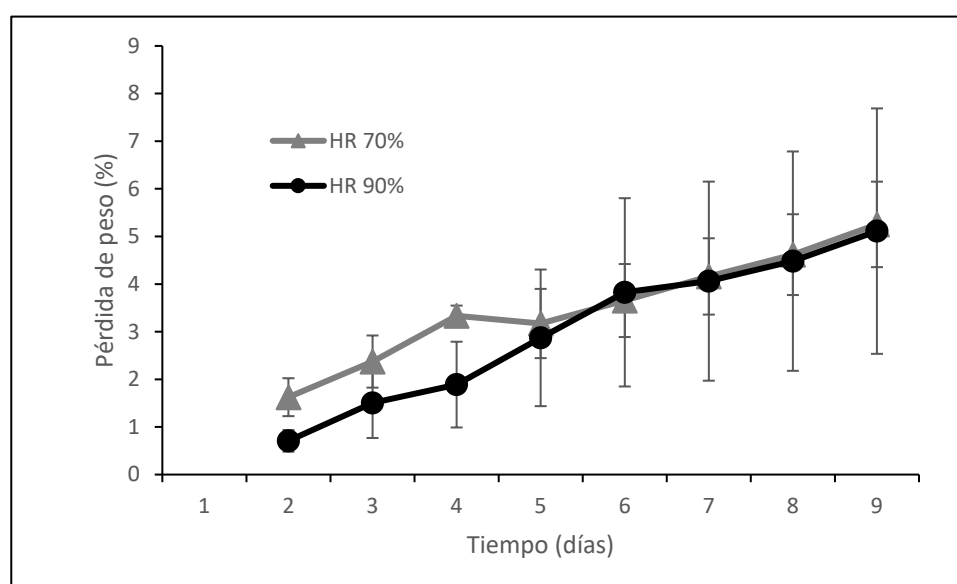


Figura 4. Pérdida de peso media (media ± desviación estándar, n=3) en tubérculos de tubérculos de ñampín almacenados a 24±1°C bajo 70 o 90% de humedad relativa.

La aplicación de un choque térmico subletal aumenta la termorresistencia de *Bacillus subtilis* a tratamientos isotérmicos

The application of a sublethal heat shock increases the heat resistance of *Bacillus subtilis* to isothermal treatments

A. Luciano^{1*}, S. Guillén^{1,2}, P. Fernández Escámez¹, A. Palop Gómez¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2—(Universidad de Zaragoza-CITA), 50013, Zaragoza, España.

*antonio.luciano@upct.es

Resumen

El estrés ambiental y la aplicación de tecnologías de procesado y conservación de los alimentos, como la exposición al calor y la acidez, pueden desencadenar respuestas adaptativas en las bacterias. Factores previos al tratamiento térmico, como la exposición a un medio ácido o la aplicación de un choque térmico, pueden afectar a la termorresistencia de los microorganismos. En este estudio, se evaluó la resistencia al calor de células vegetativas de *Bacillus subtilis*, y se investigó cómo los choques térmicos previos influían en esta resistencia. Se determinó la resistencia al calor a 52,5°C en agua de peptona, de células expuestas, o no, a un choque térmico subletal previo (5 min a 38 o 40 °C). Los experimentos realizados evidenciaron una tendencia bifásica en la curva de supervivencia donde a un cierto tiempo (tiempo de transición) se notaba un cambio de la pendiente. Estos resultados demuestran que la resistencia al calor de *B. subtilis* se ve influenciada por las condiciones previas al tratamiento.

Palabras clave: Tratamiento térmico; estrés ambiental; tiempo de transición.

Abstract

Environmental stress and the application of food processing and preservation technologies, such as exposure to heat and acidity, can trigger adaptive responses in bacteria. Factors prior to heat treatment, such as exposure to an acidic medium or the application of a heat shock, can affect the heat resistance of microorganisms. In this study, the heat resistance of vegetative cells of *Bacillus subtilis* was evaluated, and the influence of previous heat shocks on heat resistance was investigated. Heat resistance was determined at 52.5 °C in peptone water, to cells exposed, or not, to a previous heat treatment (5 min at 38 or 40 °C). The experiments conducted showed a biphasic trend in the survival curve where a change in the slope was observed after a certain time (transition time). These results demonstrate that the heat resistance of *B. subtilis* is influenced by the pre-treatment conditions.

Keywords: Thermal treatment; environmental stress; transition time.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés térmico ejerce una influencia significativa en la morfología y en la fisiología celular, dando lugar a una serie de cambios fenotípicos y moleculares. Este fenómeno altera la homeostasis de las células, desencadenando eventos como el desdoblamiento de proteínas y la formación de agregados proteicos bajo condiciones de aumento rápido de la temperatura. Las temperaturas elevadas no solo afectan la viabilidad celular al obstaculizar funciones vitales como el crecimiento y la proliferación, sino que también pueden llevar a la muerte celular. Sin embargo, el estrés térmico no siempre conduce a resultados letales; de hecho, puede provocar una mayor resistencia a condiciones adversas a través del desarrollo de proteínas de choque térmico (HSP). Estas proteínas no solo protegen contra el estrés térmico, sino que también pueden conferir resistencia cruzada a otros estímulos (1). La respuesta a un choque térmico, mediada por chaperonas y factores de transcripción como el factor sigma B, es crucial para mantener la homeostasis y eliminar proteínas mal plegadas (2). En bacterias como *Bacillus*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, el factor sigma B desempeña un papel esencial en la regulación de la respuesta al estrés térmico (3–5). En este contexto, el objetivo de este estudio fue investigar el efecto inducido por un choque térmico a varias temperaturas en la termorresistencia de *Bacillus subtilis* BC168.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo

La cepa de *B. subtilis* BC168 utilizada en este estudio fue suministrada por NIZO (Ede, Países Bajos). La cepa se mantuvo congelada a -80 °C hasta su uso. Para la obtención del cultivo, se inoculó un tubo de 5 mL de caldo LB (Scharlab, Barcelona, España) con una colonia aislada previamente en una placa de agar LB (Scharlab) y se incubó a 37 °C durante 12 horas. Pasadas las 12 horas, una alícuota de 33 µL fue transferida a un frasco con 33 mL de caldo LB y se volvió a incubar a 37 °C durante otras 12 horas con agitación constante de 200 rpm.

2.2 Choques térmicos y tratamientos isotérmicos

Las temperaturas para la aplicación de los choques térmicos fueron 38 y 40 °C. Una vez obtenido el cultivo de células vegetativas, se inocularon 200 µL en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo LB atemperado a la temperatura correspondiente. Se mantuvieron a estas temperaturas durante 5 minutos induciendo un choque térmico en las células vegetativas. Una vez pasado ese tiempo, 200 µL fueron inoculados en un Termorresistómetro Mastia (6). El termorresistómetro contenía 400 mL de agua de peptona. Los tratamientos isotérmicos fueron realizados a la temperatura de 52,5 °C.

2.3 Análisis de los resultados

Los modelos se ajustaron a los datos obtenidos en condiciones isotérmicas utilizando el enfoque de un paso con el paquete de bioinactivation para R (7). El modelo que se utilizó en esta investigación fue el Bigelow transition. Este modelo nos permite, una vez insertados los datos, evaluar las dos pendientes de una curva bifásica. Así como evaluar los valores *D*, tiempo de reducción decimal, de las diferentes pendientes y además el tiempo de transición, es decir, el tiempo en el cual cambia la pendiente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la gráfica de supervivencia obtenida tras el tratamiento a 52,5 °C de células sin choque térmico. La Figura 2A muestra la correspondiente gráfica de supervivencia obtenida tras el tratamiento a 52,5 °C de células expuestas a un choque térmico de 38 °C durante 5 min. Ambas figuras muestran curvas de inactivación bifásicas. Además, se observó un aumento de la resistencia al calor, de más del doble en el valor *D*₁, correspondiente a la primera pendiente. Esto es similar a los resultados obtenidos por Georgalis et al. (8). De acuerdo a ese estudio, este tipo de

curvas representan una adaptación dinámica durante el choque térmico. Es decir, las células responden a la exposición de temperaturas altas activando sus mecanismos de respuesta al estrés, resultando en un incremento de la resistencia térmica.

La Figura 2B muestra los resultados obtenidos tras la aplicación del choque térmico a 40 °C. En este caso se observó también un aumento similar de la resistencia al calor con respecto al control y la misma tendencia bifásica. Sin embargo, la presencia de dos pendientes en las gráficas de supervivencia difiere a lo observado en Georgalis et al., donde las células de *Bacillus subtilis* no mostraron esta tendencia bifásica después del choque térmico, debido probablemente a diferencias en el diseño experimental, ya que las temperaturas de choque térmico fueron diferentes (8).

Los datos se modelizaron utilizando el modelo de Bigelow con transición. Los parámetros obtenidos fueron los valores *D* de las diferentes pendientes de la curva bifásica y el tiempo de transición (Tabla 1). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores *D*1 y los tiempos de transición obtenidos en los tratamientos con y sin choque térmico. El valor *D*1 aumentó más del doble de su valor al aplicarse el choque térmico, independientemente de la temperatura de choque térmico. Esto fue similar para el tiempo a partir del cual cambia la pendiente de la curva, tras la aplicación del choque térmico, independientemente de la temperatura. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los valores *D*2 de ninguno de los tratamientos ni entre los parámetros obtenidos tras la aplicación de los choques térmicos a las diferentes temperaturas. Estos resultados demuestran que la aplicación de un choque térmico subletal previo al tratamiento térmico, induce un aumento de la resistencia al mismo.

4. CONCLUSIONES

Con este estudio se demuestra que, tras la exposición a un choque térmico subletal, las células de *Bacillus subtilis* se vuelven más resistentes al posterior tratamiento térmico. Eso confirma nuestra hipótesis de que los tratamientos previos pueden influir en la termorresistencia bacteriana, en este caso aumentándola significativamente.

5. AGRADECIMIENTOS

Antonio Luciano agradece el proyecto PID2020-116318RB-C32, titulado "Descontaminación y tratamiento durante el procesado con antimicrobianos naturales en nanoemulsión para garantizar la seguridad de bebidas vegetales y smoothies pasteurizados", financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033, por concederle un contrato predoctoral.

6. REFERENCIAS

1. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell*. 2010;40(2):253, 66.
2. Schumann W. Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(6):959-68.
3. Van Schaik W, Abee T. The role of σ B in the stress response of Gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(2):218-24.
4. Somolinos M, Espina L, Pagán R, García D. sigB absence decreased *Listeria monocytogenes* EGD-e heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. *Int J Food Microbiol*. 2010;141(1-2):32-8.
5. Periago PM, Van Schaik W, Abee T, Wouters JA. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(7):3486-95.
6. Conesa R, Andreu S, Fernández PS, Esnoz A, Palop A. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *J Appl Microbiol*. 2009;107(2):506-13.
7. Garre A, Fernández PS, Lindqvist R, Egea JA. Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Res Int*. 2017;93:66-74.

8. Georgalis L, Yeak KYC, Tsimpou C, Fernandez PS, Wells-Bennik M, Garre A. Disentangling the contributions of initial heterogeneities and dynamic stress adaptation to nonlinearities in bacterial survival curves. Food Res Int. 2023;173:113385.

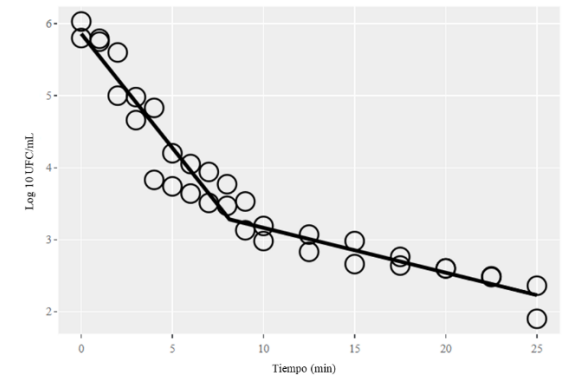


Figura 1. Gráfica de supervivencia de *Bacillus subtilis* en agua de peptona a 52,5 °C.

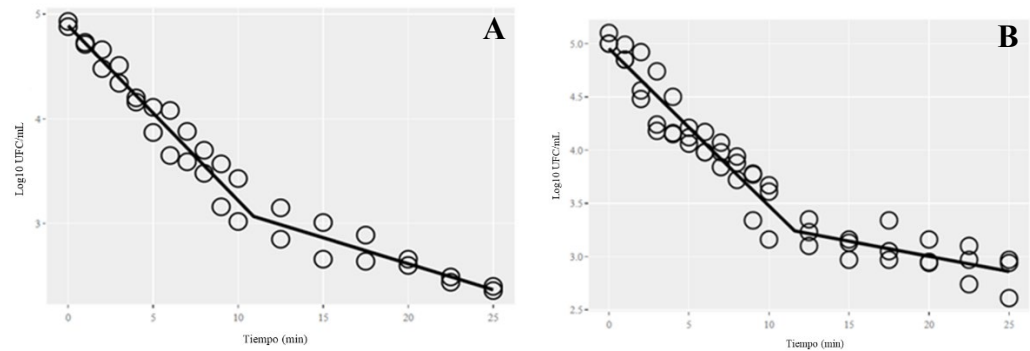


Figura 2. Gráficas de supervivencia de *Bacillus subtilis* en agua de peptona a 52,5 °C con un choque térmico a 38 °C (A) y 40 °C (B) durante 5 min.

Tabla 1. Valores *D* y tiempos de transición obtenidos en los diferentes tratamientos térmicos en función de la temperatura de choque térmico.

Temperatura choque térmico (°C)	Valor <i>D</i> 1 (min)	Valor <i>D</i> 2 (min)	Tiempo de transición (min)
-	2,41 ± 0,25 ^a	12,42 ± 1,33 ^a	5,71 ± 0,53 ^a
38	5,96 ± 0,33 ^b	20,14 ± 3,79 ^a	10,87 ± 0,88 ^b
40	6,74 ± 0,41 ^b	35,18 ± 11,16 ^a	11,53 ± 0,83 ^b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los datos de una misma columna.

Extracción asistida por ultrasonidos mediante sonda de compuestos fenólicos en subproductos de floretes de brocoli

Ultrasound assisted extraction with probe of phenolic compounds from broccoli florets by-products

H. Seyeinzeinab^{1*}, L. Martínez-Zamora^{1,2}, M. Cano-Lamadrid¹, F. Artés-Hernández¹

¹Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Departamento de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*seyedehzeinab.hashemi@edu.upct.es

Resumen

Minimizar la pérdida y desperdicio de alimentos es crucial para lograr una producción y consumo más sostenibles, por lo que revalorizar subproductos agroalimentarios promoviendo la economía circular es una tarea fundamental. Estos residuos pueden ser reutilizados en diferentes sectores como la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética. Este trabajo se enfoca en la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos mediante sonda de compuestos poli fenólicos de subproductos de floretes de brócoli. Se han explorado y evaluado parámetros clave en la extracción, como la temperatura, la selección de solvente y el tiempo de extracción. Los resultados muestran una baja extracción en compuestos fenólicos. La proporción adecuada de solvente es crucial para una extracción eficiente, siendo más efectiva la proporción 75:25 de etanol-agua.

Palabras clave: *Brassica oleracea* var Italica; capacidad antioxidante total; ultrasonidos; compuestos bioactivos; revalorización.

Abstract

Minimizing food loss and waste throughout the food chain is crucial for sustainable production and consumption, so revalorization of agri-food waste is important, promoting a circular economy. These by-products can be reused in various sectors, such as food, pharmaceutical, or cosmetic industries. This work focuses on optimizing the ultrasound-assisted extraction with probe of polyphenols from broccoli florets by-products. Key parameters, including extraction temperature, solvent selection, and extraction time, have been explored and evaluated. Results show a low extraction of polyphenolic compounds, due to their low presence in broccoli. The appropriate solvent ratio is crucial for efficient phenolic extraction, being more effective with a 75:25 ethanol-water composition.

Keywords: *Brassica oleracea* var; total antioxidant activity; ultrasounds; bioactive compounds; revalorization.

1. INTRODUCTION

Broccoli is a plant widely recognized for its nutritional benefits and its crucial role in food security and the global economy. This vegetable has gained popularity due to its bioactive compound content and culinary versatility. Therefore, the importance of broccoli cultivation is discussed from a nutritional and economic perspective, highlighting its health properties and its contribution to sustainable agriculture (1).

Although statistics may vary from year to year and from source to source, according to data available through 2021, the global area under broccoli cultivation is estimated at 3 million hectares (2). Annual broccoli production exceeds 25 million tons worldwide (2). Broccoli is a plant widely recognized for its nutritional benefits and its crucial role in food security and the global economy. This vegetable has gained popularity due to its bioactive compound content and culinary versatility. Therefore, the importance of broccoli cultivation is discussed from a nutritional and economic perspective, highlighting its health properties and its contribution to sustainable agriculture.

Fruit and vegetable by-products are the remains, unused parts or by-products generated during the production, processing and consumption of fruits and vegetables. These by-products include skins, peels, seeds, pulps, and other parts that are often discarded or used to a lesser extent. On the European continent, approximately one-third (33%) of the items intended for human nutrition end up being discarded, while in the fruit and vegetable category, this figure rises to 46% (2).

The main objective of the present work is the optimization of the ultrasound-assisted extraction with a probe, as a green technology, of phenolic compounds from broccoli florets by-products.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials, reagents, and instrumentation

Broccoli by-products were provided by Grupo Lucas S.L. (El Raal, Murcia, Spain) in September 2022 after handling their conditioning lines. The broccoli variety 'Naxos F1 Hybrid Broccoli' from Sakata was used. After freeze-drying, particle size reduction was carried out using a Taurus® aromatic electric mill (Barcelona, Spain) with a power of 150 W for 10-15 s. The system used for extraction consists of 3 pieces of equipment: (1) The ultrasound unit (Fisherbrand™ Sonicador Q705, Massachusetts, USA) has a 110 V voltage probe, using a power of 700 W at a frequency of 20 kHz; (2) The base that heated the samples to the desired temperature; (3) Thermometer for temperature reading. The process was carried out in intermittent stages (30 s On-Off pulses), adjusting to the time defined according to the criteria established in the methodology.

2.2 Methodology

The experimental design was based on the Response Surface Methodology (RSM) to find the optimal conditions for the extraction of phenolic compounds by ultrasound. The continuous variables used in the experimental design were solvent (0 to 100% ethanol), time (10, 20, and 30 min), and temperature (25, 40, and 55 min). The fixed variables were selected based on previous studies and preliminary tests (3) (Table 1): Ratio S:L → 1 g in 25 mL; Amplitude → 80 % (W = J/s); Pulse/Cycle (Duty cycle) → 30s On 30s Off; Particle size → 4 µm. The results obtained from the conditions studied were analyzed using the Folin-Ciocalteu method (4) and results were expressed as g of Gallic Acid Equivalents (GAE)/kg.

2.3 Statistical processing

The R software was used to create the statistical design and the XLSTAT program was used to generate the box-plot figures. The data obtained were subjected to a simple analysis of variance considering a triple interaction (solvent percentage × extraction temperature × extraction time).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the values of total phenolic compounds graphically, divided into two sub-graphs: on the left is a box-plot graph and on the right is a two-dimensional graph. In the first one, the minimum and maximum values obtained are 2.69 g GAE/kg and 4.74 g GAE/kg, respectively. Another value shown in the box-plot of Figure 1 is the median, which corresponds to 3.663 g

GAE/kg along with a range of more common values between 3.387 and 4.029 g GAE/kg ps. With these data, and according to the literature, it can be observed that the amount of total phenolic compounds is not high when compared to other fruit and vegetable products such as pomegranate peel (332.5 g GAE/kg) (5). The values found are similar to those reported in broccoli by-products by other authors, such as Cao et al., (6) with an average of 2.73 g GAE/kg.

It has been observed that the variation of total phenolic content among the combinations studied was very small (0.642 g GAE/kg between the first and third quartile), due to the low concentration of CFT present in broccoli, as observed in this experience, and as reported by other authors (6).

4. CONCLUSIONS

It has been evidenced that an optimal ratio of 75:25 ethanol-water favors the extraction of phenolic compounds. However, neither the plant material used nor the extraction method is the most appropriate for the polyphenolic compound's characterization profile. Therefore, it is proposed to continue the research by exploring the comparison of the extraction of other parts of broccoli, such as leaves or stems, with the aim of achieving a more complete and detailed analysis.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge grant PID2021-123857OB-I00, funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and FEDER, and grant PRTR-C17.I1 AGROALNEXT, supported by MICIU with funding from EU NextGenerationEU and by Fundación Séneca with funding from CARM. LMZ thanks Margarita Salas postdoctoral contract at UM funded by the EU NextGenerationEU.

6. REFERENCIAS

1. Vasanthi H, Mukherjee S, Das D. Potential Health Benefits of Broccoli- A Chemico-Biological Overview. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2009;
2. FAO. FAOSTAT. 2022 [cited 2022 Mar 8]. FAOSTAT statistics database. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
3. Artés-Hernández F, Martínez-Zamora L, Cano-Lamadrid M, Hashemi S, Castillejo N. Genus Brassica By-Products Revalorization with Green Technologies to Fortify Innovative Foods: A Scoping Review. Foods [Internet]. 2023 Jan 27;12(3):561. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/3/561>
4. Singleton, V.L.; Rossi JA Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16(3):144–58.
5. Cano-Lamadrid M, Martínez-Zamora L, Castillejo N, Artés-Hernández F. From Pomegranate Byproducts Waste to Worth: A Review of Extraction Techniques and Potential Applications for Their Revalorization. Vol. 11, Foods. MDPI; 2022.
6. Cao Y, Song Z, Dong C, Ni W, Xin K, Yu Q, et al. Green ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent extraction of phenolic compounds from waste broccoli leaves: Optimization, identification, biological activity, and structural characterization. LWT [Internet]. 2023 Oct;115407. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643823009866>

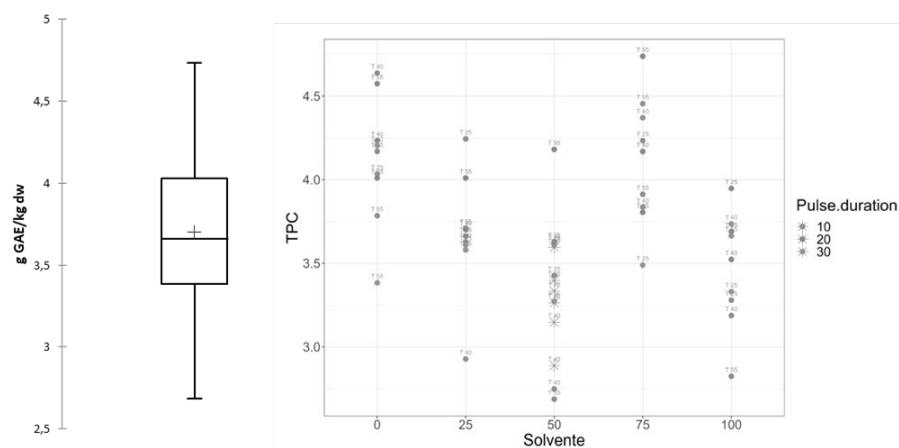


Figure 1. On the left box-plot diagram of the amount of total phenolic compounds and on the right the representation of these values versus solvent types, temperatures, and pulse durations.

Table 1. Summary of the conditions used during extraction in the experimental design.

Nº	% EtHO	min	°C	Nº	% EtHO	min	°C
1	0	10	55	26	50	20	55
2	50	20	40	27	100	20	55
3	50	10	55	28	100	10	40
4	50	10	40	29	0	30	40
5	50	20	40	30	75	30	25
6	25	30	40	31	50	20	40
7	25	10	40	32	75	30	40
8	25	10	55	33	25	20	40
9	100	10	55	34	25	10	25
10	0	10	25	35	100	20	25
11	50	20	40	36	75	20	40
12	0	30	55	37	25	30	55
13	0	30	25	38	100	30	40
14	75	20	25	39	50	30	25
15	25	20	25	40	25	30	25
16	50	10	25	41	25	20	55
17	0	20	25	42	75	30	55
18	50	30	40	43	100	20	40
19	0	20	40	44	75	20	55
20	75	10	25	45	100	10	25
21	75	10	55	46	50	20	25
22	50	30	55	47	100	30	25
23	50	20	40	48	0	20	55
24	100	30	55	49	50	20	40
25	75	10	40	50	0	10	40

Evaluación *in vitro* de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de una bebida funcional obtenida a partir de subproductos agrícolas

In vitro evaluation of the bioaccessibility of phenolic compounds of a functional beverage obtained from agricultural by-products.

J.A Salas-Millán^{1,2*}, A. Conesa-Bueno², E. Aguayo¹

¹Grupo de Postcosecha y Refrigeración. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²JimboFresh International SLL, C/ Mina Buena Suerte, 1, 30360, La Unión, España.

*joseangel.salas@upct.es

Resumen

La fermentación es una técnica que permite la revalorización de subproductos en nuevos alimentos enriquecidos en compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. Sin embargo, estos bioactivos experimentan transformaciones durante la digestión gastrointestinal. El objetivo de este estudio es analizar la evolución y bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de una bebida fermentada de subproductos de brócoli. Esta bebida contiene ácidos hidroxycinámicos y flavonoides, cuyas concentraciones disminuyen durante la digestión oral, gástrica e intestinal. Sin embargo, los flavonoides acilados son hidrolizados por las enzimas intestinales a flavonoides deacilados, como el kaempferol-3,7-o-diglicósido, incrementando su concentración durante la digestión intestinal y mostrando una mayor bioaccesibilidad por difusión pasiva (diálisis). Este estudio revela la evolución y bioaccesibilidad *in vitro* de estos compuestos fenólicos y aquellos compuestos no asimilados que podrían ser transformados por la microbiota intestinal.

Palabras clave: brassica, INFOGEST, polifenol, fermentación.

Abstract

Fermentation is a process that allows the revalorisation of by-products into new foods enriched in bioactive compounds beneficial to health. However, these bioactives undergo transformations during gastrointestinal digestion. The aim of this study is to analyse the *in vitro* evolution and bioaccessibility of phenolic compounds in a fermented broccoli by-product beverage. This beverage contains hydroxycinnamic acids and flavonoids, whose concentrations decrease during oral, gastric and intestinal digestion. However, acylated flavonoids are hydrolysed by intestinal enzymes to deacylated flavonoids, such as kaempferol-3,7-o-diglycoside, increasing their concentration during intestinal digestion, and showing increased bioaccessibility by passive diffusion (dialysis). This study reveals the *in vitro* evolution and bioaccessibility of these phenolic compounds, and those unassimilated compounds that could be transformed by the intestinal microbiota.

Keywords: brassica, INFOGEST, polyphenol, fermentation.

1. INTRODUCCIÓN

El brócoli es una hortaliza conocida por su contenido en fitoquímicos saludables. Sin embargo, solo se utiliza una parte de la planta, dejando una gran cantidad de biomasa sin

aprovechar. Los procesos de fermentación permiten la transformación de las propiedades físicas, químicas y sensoriales de alimentos. Así, la fermentación se presenta como una solución en la revalorización de estos subproductos, ofreciendo una alternativa prometedora para desarrollar nuevos alimentos ricos en compuestos bioactivos (1). Sin embargo, durante la ingesta de estos alimentos, los compuestos bioactivos pueden liberarse de la matriz, degradarse, absorberse o pasar al colon donde seguirán biotransformándose por la microbiota intestinal. Este estudio aborda y evalúa la evolución de los compuestos fenólicos de una bebida fermentada de subproductos de brócoli durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y su bioaccesibilidad mediante difusión pasiva.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Elaboración de bebida fermentada

Para la fermentación de subproductos de brócoli, se emplearon hojas de brócoli frescas, que se sumergieron en agua potable en una proporción de 1:10 (p/p) en un biorreactor Bionet F0-2CC (Bionet, Fuente Álamo, España) en condiciones asépticas. Para el comienzo de la fermentación se usó un inóculo de *Lactiplantibacillus plantarum* (6 log UFC /mL). La fermentación se llevó a cabo durante 4 días a 27,7 °C, según ensayos previos de optimización (1).

2.2 Digestión gastrointestinal *in vitro*, índice de recuperación (%IR) y porcentaje de bioaccesibilidad (BA%)

La evaluación de bioaccesibilidad se realizó mediante el ensayo gastrointestinal *in vitro* de acuerdo con el protocolo INFOGEST (2). Esta metodología incluye diferentes etapas de digestión oral, gástrica e intestinal. Esta última se llevó a cabo mediante diálisis, simulando la difusión pasiva de los compuestos fenólicos durante la digestión intestinal, usando un tubo de membrana de diálisis Spectrum™ 132706 (12–14kDa; Fisher Scientific, USA). El ensayo de digestión gastrointestinal se llevó a cabo por triplicado y se tomaron muestras en cada etapa de la digestión y durante la digestión intestinal en intervalos de 30 min (30, 60, 90, 120, 150 y 180 min). Se calculó el índice de recuperación (%RI), que permite conocer la cantidad de compuestos fenólicos recuperados tras las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal y diálisis, comparándolo con la bebida fermentada sin digerir (3). El porcentaje de bioaccesibilidad (%BA) se calculó comparando la concentración de compuestos fenólicos de la fracción de diálisis con la fracción de digestión intestinal ($\%BA = [DD/DG]*100$).

2.3 Análisis de compuestos fenólicos individuales

Los polifenoles individuales fueron analizados por cromatografía líquida de espectrometría de masas (LC-MS), siguiendo la metodología y el equipamiento descrito por Salas-Millán et al. (2024) (1).

2.3 Tratamiento estadístico descriptivo

Los resultados se presentan como el promedio de tres experimentos $\pm$ la desviación estándar.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La bebida fermentada (BF) de hoja de brócoli destacó en su diversidad de compuestos fenólicos (Fig. 1), incluyendo ácidos hidroxicinámicos (AH), flavonoides acilados (FlavA) y flavonoides deacilados (FlavD). En la Fig. 1A se muestra los índices de recuperación (%IR) de los compuestos fenólicos individuales durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. La concentración de AH totales disminuyó tras la digestión oral (DO) y gástrica (DG), con un valor de %IR de 79,4% y 72%, respectivamente. El grupo de FlavA redujo su concentración tras las fases DO y DG, con un valor de 73,7 % IR. Por otro lado, los FlavD experimentaron una mayor reducción tras los procesos de DO y DG (59,1 % IR). Estas diferencias entre ambos grupos de flavonoides se

deben a que los FlavA presentan una mayor resistencia frente a procesos gastrointestinales *in vitro* y pH ácido (4). Seguidamente, la fracción gástrica fue sometida a una digestión intestinal (DI). Tras los primeros 30 min de DI, los tres grupos de compuestos fenólicos mostraron unos valores de 22 a 28 %IR. Sin embargo, a lo largo de la DI(30-180 min), se observó un aumento en kaempferol-3,7-o-diglucósido (K-3,7dG, 14,4 a 56,3 mg/L). La fracción dializada (DD) destacó también por una mayor concentración de K-3,7dG, y kaempferol-o-3-soforósido-7-o-glucósido (K-3Soph-7G), con una concentración de 56,3 y 0,13 mg/L respectivamente, mostrando un valor de IR mayor al 80%. Este aumento de FlavD durante la DI y DD es debido a la hidrólisis de los FlavA por enzimas hidrolíticas del fluido intestinal artificial (amilasas, lipasas, y proteasas) a pH básico. Durante esta etapa, los flavonoides glicosilados acilados y/o deacilados pueden ser hidrolizados en flavonoides con menor número de glicosilaciones, en sus formas agliconas (kaempferol), o en otros compuestos no detectables (5).

La evaluación de bioaccesibilidad (%BA) *in vitro* tuvo en cuenta la concentración de polifenoles de la fracción dializada tras el proceso de DI y la concentración en la fracción de DG (Fig. 1B y C). Entre los compuestos AH destacaron el 5CQa y 4CQa con unos valores de 56 y 36 %BA. Así, las concentraciones de 3-, 4-, y 5CQa en la fracción DD fue de 0,9 a 1,3 mg/L. En cambio, los derivados de ácido ferúlico y sinápico mostraron un porcentaje de BA menor al 20 %BA. El grupo de FlavA presentó un rango de 13 a 26 %BA, excepto para kaempferol-3-o-cafeoil-soforósido-7-o-sinapoilglucósido (104%) y kaempferol-3-o-feruloil-soforósido (K-3FeSoph, 270%). Estos resultados muestran una mayor difusión pasiva *in vitro* de estos compuestos provenientes de la DG. El aumento en el %BA de K-3FeSoph sugiere la hidrólisis del enlace glicosílico y acilado de su precursor diglicosilado kaempferol-3-o-feruloil-soforósido-7-o-glicósido y su posterior difusión pasiva. Los compuestos del grupo de FlavA K-3,7dG y K-3Soph-7G presentaron unos valores de %BA de 150 y 390 %, provenientes de la hidrólisis de los FlavD durante la DI, como anteriormente se ha discutido. Los compuestos fenólicos presentes tras la digestión intestinal corresponden a la fracción de compuestos que no han sido asimilados y que podrían pasar al colon. Entre ellos, FlavD como K-3Soph-7G y K-3,7dG; y FlavA como kaempferol-3-o-sinapoil-soforósido-7-o-glucósido y kaempferol-3-o-feruloil-soforósido-7-o-glucósido, que potencialmente serían metabolizados por la microbiota del colon (6).

4. CONCLUSIONES

La bebida fermentada de subproductos de brócoli destacó por su contenido en ácidos hidroxicinámicos y flavonoides deacilados y acilados. Durante la fase de digestión oral y gástrica *in vitro* se redujo la concentración de estos bioactivos, principalmente ácidos hidroxicinámicos. Los resultados de cuantificación e índice de recuperación mostraron una mayor reducción durante la fase de digestión intestinal. Sin embargo, la degradación de los flavonoides acilados va acompañada de un aumento en la concentración de flavonoides deacilados glicosilados. Esto se debe a la hidrólisis por las enzimas intestinales, que simplifican estos flavonoides a estructuras con menor grado de glicosilación. Estos flavonoides deacilados, como kaempferol-3,7-o-diglicósido, mostraron una mayor concentración en la fracción dializada, sugiriendo una mayor asimilación durante la digestión intestinal. Finalmente, los compuestos fenólicos no absorbidos durante la digestión intestinal proporcionan una base para futuros ensayos sobre las fracciones no asimiladas y su potencial beneficio para la salud del colon, como su biotransformación por parte de la microbiota intestinal.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es resultado del programa AGROALNEXT y ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN) con fondos de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.11) y por la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma Región de Murcia. J.A. Salas-Millán agradece el apoyo financiero recibido del MCIN y de JimboFresh International SLL a través de una beca 'Industrial PhD' (DIN2019-010837).

6. REFERENCIAS

1. Salas-Millán JÁ, Conesa-Bueno A, Aguayo E. A novel antidiabetic lactofermented beverage from agro-industrial waste (broccoli leaves): Process optimisation, phytochemical characterisation, and shelf-life through thermal treatment and high hydrostatic pressure. *Food Biosci.* 2024 Jun 1;59:103999.
2. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc [Internet]*. 2019 Mar 18 [cited 2024 Apr 10];14(4):991–1014. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41596-018-0119-1>
3. Lucas-González R, Viuda-Martos M, Pérez Álvarez JA, Fernández-López J. Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2018 Aug 1;256:252–8.
4. Zhao CL, Yu YQ, Chen ZJ, Wen GS, Wei FG, Zheng Q, et al. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. Vol. 214, *Food Chemistry*. Elsevier; 2017. p. 119–28.
5. Porfírio S, Falé PLV, Madeira PJA, Florêncio MH, Ascensão L, Serralheiro MLM. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. *Food Chem.* 2010 Sep 1;122(1):179–87.
6. Sánchez-Velázquez OA, Mulero M, Cuevas-Rodríguez EO, Mondor M, Arcand Y, Hernández-Álvarez AJ. In vitro gastrointestinal digestion impact on stability, bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols from wild and commercial blackberries (*Rubus* spp.). *Food Funct [Internet]*. 2021 Aug 16 [cited 2024 Apr 11];12(16):7358–78. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/fo/d1fo00986a>

Figura 1. Índice de recuperación (A) de los compuestos fenólicos de la bebida fermentada de brócoli (BF) en las diferentes etapas de digestión *in vitro*: digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal (DI) en periodos de 30 minutos (30-180) y difusión pasiva por diálisis (DD). Porcentaje de bioaccesibilidad de ácidos hidroxicinámicos (B) y flavonoides (C) tras la digestión intestinal.

Diferencias en el peso molecular del Ácido Hialurónico producido por *Streptococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*

Differences in the molecular weight of Hyaluronic Acid produced by *Streptococcus spp.* and *Lactobacillus spp.*

M. Victoria*, A. López-Cánovas, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez

Grupo de Ingeniería del Frío y de la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*miguel.victoria.sanes@upct.es

Resumen

El Ácido Hialurónico (HA) es un mucopolisacárido con grandes aplicaciones en campos como la biomedicina y bioingeniería por sus excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas. Su peso molecular determina sus posibles aplicaciones, ya que el HA de alto peso molecular (HMW-HA) y el HA de bajo peso molecular (LMW-HA) poseen aplicaciones distintas. El peso molecular depende de la fuente de la que provenga este HA. En este trabajo se muestran las diferencias de peso molecular entre el HA producido a partir de *Streptococcus spp.* y bacterias GRAS (*Generally Recognized As Safe*) como *Lactobacillus spp.* Además, se estudiaron tres técnicas diferentes (viscosimetría, electroforesis y UPLC-SEC) para el análisis del peso molecular de este polímero.

Palabras clave: Biorreactor; Fermentación; Bacterias GRAS.

Abstract

Hyaluronic Acid (HA) is a mucopolysaccharide with great applications in fields such as biomedicine and bioengineering due to its excellent physical, chemical and biological properties. Its molecular weight determines its possible applications since high molecular weight HA (HMW-HA) and low molecular weight HA (LMW-HA) have different applications. The molecular weight depends on the source from which this HA comes in this work, the differences in molecular weight between HA produced from *Streptococcus spp.* and GRAS (*generally recognized as safe*) bacteria such as *Lactobacillus spp.* In addition, three techniques were studied (viscosimetry, electrophoresis and UPLC) to analyze the molecular weight of this polymer.

Keywords: Bioreactor; Fermentation; GRAS bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico (HA) o también conocido como hialuronato, es un glucosaminoglicano, mucopolisacárido, no sulfatado que está formado por pares de disacáridos: N-acetil glucosamina y ácido glucurónico, unidos mediante enlaces alternos de β -1,4-d-glucurónico y β -1,3-N-acetil-d-glucosamina. Debido a su alta solubilidad y capacidad de retención de agua, forma soluciones altamente viscosas con propiedades viscoelásticas únicas. Además, el HA destaca por otras excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas; como son su alta biocompatibilidad, biofuncionalidad nativa y no-inmunogenicidad. En conjunto, esto permite su aplicación en amplios campos de bioingeniería y biomedicina: desde cosméticos bio-revitalizantes y endoprótesis de líquido articular, medicamentos, oftalmología, reumatología y en la industria alimentaria (1).

El HA contiene entre 500 y 50.000 residuos de monosacáridos por molécula, por lo tanto, HA puede presentar una amplia gama de pesos moleculares desde aproximadamente 10^3 a 10^7

Da. En estudios anteriores, se ha observado una estrecha relación entre la función biológica y el peso molecular (MW) del HA, además de que los diferentes grados de polidispersión del HA varían en función de la fuente de producción de HA (1).

El aumento del MW del HA y el contenido de HA en soluciones poliméricas, conduce al refuerzo de la red tridimensional del polímero. En consecuencia, da como resultado un aumento en la viscosidad y viscoelasticidad de la solución (1,2). Además, se ha observado que a medida que aumenta el MW, también mejora la capacidad hidrofílica del HA (2). De esta forma, el HA de alto peso molecular (HMW-HA $\geq 10^6$ Da) está más destinado a aplicaciones basadas en propiedades viscoelásticas y reológicas, como en la hidratación del tejido, la absorción de impactos, la disminución de las fricciones y las funciones de relleno de espacios. El HA de bajo peso molecular (LMW-HA $< 10^6$ Da) también se aplica en el área alimentaria. En concreto, se usa como ingrediente en suplementos dietéticos y aditivos alimentarios reponiendo así la cantidad necesaria de HA en el cuerpo (que va disminuyendo con la edad), activando a su vez las células de la piel a través de la hidratación epidérmica y reduciendo el envejecimiento de la piel. El LMW-HA también se usa en materiales de envasado para la conservación de los alimentos (2).

El HA comenzó a extraerse a partir de tejidos animales, sin embargo, este método cuenta con una variedad de inconvenientes (impurezas, toxinas, etc.) en la extracción de HA de dichos tejidos animales, por lo que se ha generado mucho interés en buscar otras fuentes de origen no animal. Como método alternativo, destaca la producción de HA por microorganismos, distinguiendo las bacterias *Streptococcus* spp. del grupo A y C de Lancefield por su alta producción natural de HMW-HA. Estos microorganismos sintetizan HA, formando una cápsula extracelular a modo de autodefensa para no ser detectados por el sistema inmune del huésped, provocando así respuestas inmunogénicas más fuertes. Sin embargo, *Streptococcus* spp. son bacterias patógenas para animales, por lo que es recomendable usar otras bacterias GRAS (*Generally Recognized As Safe*) como las bacterias ácido-lácticas. Sin embargo, las bacterias ácido-lácticas GRAS que producen HA lo hacen con un rendimiento y peso molecular reducidos. En cuanto a la producción de HA mediante fermentación bacteriana, comparado con otras fuentes de origen animal (cresta de los gallos, humor vítreo de peces, etc.), se ha demostrado la influencia del modo de fermentación sobre las condiciones de fermentación y la composición del medio (3).

El objetivo principal de esta tesis es producir HMW-HA a partir de bacterias GRAS. Para ello se pretende modificar genéticamente bacterias ácido-lácticas productoras de HA con genes procedentes de *Streptococcus* spp. Sin embargo, previamente se debe caracterizar el HA (su peso molecular) producido por ambos microorganismos nativos, es decir, sin modificación genética. Así, en este estudio se compara el peso molecular del HA producido por bacterias nativas *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. Cabe destacar que las muestras de HA normalmente no tienen un único peso molecular, sino que son polidispersas. Por lo tanto, la caracterización del peso molecular se analizará mediante las siguientes técnicas: (i) peso molecular medio (viscosimetría); (ii) o bien mediante la distribución de los pesos moleculares (cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño (UPLC-SEC) y electroforesis).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies de *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. empleadas no se detallan debido a un acuerdo de confidencialidad con la empresa que financia esta investigación. Las cepas se activaron de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Leibniz Institute DSMZ). Para la biofermentación por ambos microorganismos se utilizó un biorreactor de 3 L de capacidad (Bionet, Fuente Álamo, Spain) de acuerdo con las condiciones descritas (4) optimizadas por nuestro grupo. Una vez completado el ciclo de fermentación (20-22 h), la extracción del HA del medio de fermentación y su posterior purificación se realizó siguiendo el protocolo de Vázquez et al. (2009). En cuanto al análisis del peso molecular del HA se utilizaron tres técnicas diferentes: viscosimetría intrínseca, electroforesis en gel de agarosa y cromatografía líquida de alta

resolución por exclusión de tamaño (UPLC-SEC). Viscosimetría intrínseca: primeramente, se prepararon tanto la disolución salina como las disoluciones problema que se deseen analizar. Se sumergió el viscosímetro en un baño de agua a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Se llenó el viscosímetro y se dejó reposar durante 30 min para homogeneizar la temperatura. Se cronometró el tiempo de avance de la disolución problema a través del viscosímetro y se determinó el MW medio a través de las ecuaciones publicadas en el método de la Pharmacopea Europea (Ph. Eur. 7.0, 1995 (01/2009)). Electroforesis: se preparó un gel de agarosa al 1% (Canvax, Valladolid, España) y TBE 1X (tampón Tris-Borato-EDTA; Panreac química, Tarragona, España). Este se almacenó durante la noche y se realizó un *pre-run* de 60 min a 40 V. A continuación, se cargaron 10 μL de las muestras y 10 μL del buffer de carga, y se realizó finalmente un *run* de 300 min a 60 V. Posteriormente, el gel se dejó en etanol 30% durante 30 min. Se añadió el colorante *stain-All* en oscuridad y se dejó en agitación leve durante la noche. El gel se pasó a un recipiente con agua destilada y se va destiñendo progresivamente para que las bandas se distingan de forma más nítida. Las bandas de las muestras problema se compararon con las de patrón para conocer su peso molecular. UPLC-SEC: El equipo utilizado para este fin fue un UPLC (Shimadzu Nexera) con una columna de exclusión por tamaño (SEC) (GFCP 6000; 300x7.8 mm; Phenomenex) específica para la separación de polímeros. Las muestras se analizaron junto con patrones de diferente peso molecular (Echelon Biosciences Inc, Salt Lake City, UT) con el fin de establecer una curva patrón. Todas las muestras y patrones se prepararon en una solución 0,2 M de NaNO_3 y filtradas a 0,20 μm . La temperatura a la que se realizó el análisis fue de 25°C , velocidad de flujo 0,6 mL/min y volumen de inyección 20 μL .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El HA obtenido a partir de *Streptococcus* spp. presentó un peso molecular superior a 1×10^6 Da, lo que se corresponde con HMW-HA (Tabla 1). Estos resultados son acordes a los estudios previos publicados (5), siendo las mínimas diferencias observadas debidas a las diferentes composiciones de los medios de fermentación con dichas publicaciones. No se profundizará en el efecto de los medios de fermentación sobre el peso molecular del HA, al no ser el objetivo específico en este estudio. En cuanto al HA obtenido a partir de *Lactobacillus* spp., se obtuvo un HA de peso molecular ligeramente superior a 1×10^4 Da, lo que se corresponde con LMW-HA (Tabla 1). El resultado obtenido es muy similar al obtenido por Chahuki et al., (2019) que obtuvieron LMW-HA de ≈ 27 KDa usando la cepa *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643. Como se observa, el HA obtenido con *Lactobacillus* spp. fue mucho menor que el obtenido con *Streptococcus* spp. Sin embargo, es preferible el uso de bacterias GRAS a ciertas especies del género *Streptococcus* spp. que son patógenas para animales, lo que hace necesarios procesos de purificación para eliminar toxinas y otros productos fermentativos que elevan considerablemente los costes de producción, además de su peligrosidad y medidas de seguridad necesarias.

Para estudiar qué técnica de análisis del peso molecular es más adecuada, se eligió el HA de mayor peso molecular, es decir, el producido por *Streptococcus* spp. La tabla 2 muestra los pesos moleculares del HA producido por *Streptococcus* spp. mediante las tres técnicas diferentes de análisis (viscosimetría, UPLC-SEC y electroforesis). Como se observa, los resultados de UPLC y electroforesis fueron similares ($p > 0,05$), sin embargo, los de viscosimetría sí que fueron diferentes ($p < 0,05$). Esto se puede atribuir a que la viscosimetría no es capaz de dar información sobre la polidispersión de la muestra, sino que solo ofrece un valor promedio del peso molecular. El hecho de que los valores obtenidos mediante UPLC y electroforesis sean iguales aumenta la confianza en estas técnicas de análisis del peso molecular del HA. Además, todas las técnicas presentan características que las hacen interesantes. La viscosimetría permite un primer análisis sencillo y barato para conocer el peso molecular medio de la muestra. Por su parte, la electroforesis permite observar el grado de polidispersión de la muestra, siendo interesante que la muestra sea lo menos polidispersa posible. Por último, la técnica de UPLC-SEC permite apreciar

con claridad la presencia de diferentes moléculas y el peso molecular en las distintas fases de cada molécula.

4. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas del presente estudio se muestran a continuación: 1) Las bacterias del género *Streptococcus* spp. son capaces de producir HMW-HA ($\geq 1 \times 10^6$ Da); 2) Las bacterias del género *Lactobacillus* spp. son capaces de producir LMW-HA (1×10^4 Da); 3) El peso molecular obtenido a partir de las bacterias del género *Lactobacillus* es de bajo MW y no puede ser utilizado para propósitos biomédicos que requieren alto MW; 4) Las bacterias del género *Lactobacillus* spp. al no ser patógenas son buenas candidatas para ser modificadas genéticamente para producir HMW-HA de forma segura; 5) Las tres técnicas han demostrado ser efectivas para determinar el peso molecular del HA; 6) El análisis mediante las tres diferentes técnicas ofrece información interesante para una mejor caracterización de la muestra.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a Jorge García Salinas por su ayuda técnica durante el desarrollo de los experimentos.

6. REFERENCIAS

1. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R, Uspenskaya M. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. Vol. 12, Polymers. 2020.
2. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. Vol. 10, Polymers. 2018.
3. Abatangelo G, Vindigni V, Avruscio G, Pandis L, Brun P. Hyaluronic acid: Redefining its role. Vol. 9, Cells. 2020.
4. Vázquez JA, Montemayor MI, Fraguas J, Murado MA. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. Microb Cell Fact. 2010;9.
5. Chahuki FF, Aminzadeh S, Jafarian V, Tabandeh F, Khodabandeh M. Hyaluronic acid production enhancement via genetically modification and culture medium optimization in *Lactobacillus acidophilus*. Int J Biol Macromol. 2019;121.

Tabla 1. Peso molecular del HA obtenido de biofermentación con *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp determinado por UPLC-SEC.

	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Peso Molecular (Da)	$1,79 \times 10^6 \pm 1,14 \times 10^6$ *	$1,53 \times 10^4 \pm 2,46 \times 10^3$

Datos diferentes (*t-student*) se indican con *

Tabla 2. Análisis de peso molecular de ácido hialurónico (*Streptococcus* spp.) con diferentes técnicas de análisis.

	Viscosimetría	UPLC-SEC	Electroforesis
Peso molecular (Da)	$9,17 \times 10^5 \pm 4,11 \times 10^5$ b	$1,79 \times 10^6 \pm 1,14 \times 10^6$ a	$2,05 \times 10^6 \pm 8,60 \times 10^5$ a

Diferencias significativas ($p < 0,05$) se muestran con diferentes letras.

Bloque II: Tecnología e Ingeniería de la Producción Vegetal

Fecundidad de *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) alimentado con diferentes especies de ácaros astigmátidos

Fecundity of *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) fed with different astigmatid mite species

M.C. Reche*, C. Grávalos, A.B. Abelaíra, V. Balanza, A. Rodríguez-Gómez, P. Bielza

Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, España.

*mariadelcarmen.reche@edu.upct.es

Resumen

El éxito del control biológico se debe a la presencia constante en el cultivo de enemigos naturales, como *Macrolophus pygmaeus*, a pesar de la fluctuación en la presencia de presa. Este logro se debe en gran parte a que estos depredadores son capaces de subsistir a partir de otros alimentos alternativos como puede ser el polen. Sin embargo, hay cultivos sin polen o este es de baja calidad, por lo que se recurre a proporcionar alimentos suplementarios. Para la alimentación de ácaros depredadores se utilizan ácaros astigmátidos, que son de bajo coste, aunque no están recomendados para los insectos depredadores. Por ello, hemos ensayado una población de *M. pygmaeus* alimentada con distintas especies de ácaros astigmátidos. La fecundidad total media presentaba diferencias significativas, ya que el número de huevos disminuía más drásticamente con unos ácaros que con otros, observándose fecundidades altas sólo en la dieta óptima de huevos de *Ephesia kuehniella*.

Palabras clave: Agentes de control biológico; control biológico; alimento alternativo; fecundidad.

Abstract

The success of biological control is due to the constant presence on the crop of natural enemies, such as *Macrolophus pygmaeus*, despite fluctuations in prey presence. This achievement is largely because these predators are capable of subsisting on alternative food sources such as pollen. However, some crops either lack pollen or it is of low quality, leading to the provision of supplementary food. For the feeding of predatory mites, astigmatid mites are used, which are low-cost, although not recommended for predatory insects. Therefore, we experimented with a population of *M. pygmaeus* fed with different species of astigmatid mites. Total average fecundity showed significant differences, as the number of eggs decreased more drastically with some mites than with others, with high fecundities observed only in the optimal diet of *Ephesia kuehniella* eggs.

Keywords: Biological control agents; biological control; alternative food; fecundity.

1. INTRODUCCIÓN

El control biológico a través del uso de depredadores generalistas ha demostrado ser altamente efectivo en numerosos cultivos (1). Este logro se debe en gran medida al empleo de depredadores omnívoros, ya que estos tienen la habilidad de consumir una gran variedad de alimentos. Cuando las presas no están presentes, estos depredadores pueden permanecer en el cultivo gracias a su capacidad para alimentarse de otros recursos alimenticios disponibles, como el polen (2). *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) es un importante enemigo

natural usado contra mosca blanca y otros artrópodos plaga en cultivos bajo invernadero. Se trata de un depredador zoofitófago capaz de completar su desarrollo cuando hay ausencia de plaga alimentándose sólo de plantas como tomate y berenjena (3). La problemática a la que nos enfrentamos es cuando *M. pygmaeus* ha de actuar en cultivos que no tienen polen o este es de baja calidad, en estos cultivos se realizan suministros de huevos de *Ephestia kuehniella* o cistos de *Artemia* para que los enemigos naturales puedan establecerse de manera preventiva. Sin embargo, estos alimentos tienen un precio alto lo que limita su utilización. Por otra parte, se suelen utilizar ácaros astigmátidos, como *Carpoglyphus lactis* o *Suidasia medanensis*, para la alimentación suplementaria en el cultivo de ácaros depredadores, ya que estos ácaros son fáciles de obtener a bajo coste y están disponibles durante cualquier época del año. Sin embargo, estas especies de ácaros astigmátidos no son un alimento adecuado para la reproducción de insectos depredadores del género *Orius* (4). Por tanto, en este estudio nos planteamos investigar el potencial de otras especies de ácaros astigmátidos como alimento alternativo para *M. pygmaeus*. De este modo, se estudió la variabilidad de la fecundidad que puede haber en una población comercial de *M. pygmaeus* alimentada con distintas especies de ácaros astigmátidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cría de *Macrolophus pygmaeus*

Se utilizó una población comercial suministrada por Agrobío. La población se mantuvo en recipientes de plástico de 1 L con papel de filtro en la tapa y con trozos de papel como escondite para evitar el canibalismo. El mantenimiento se realizó dos veces a la semana y consistió en: aporte *ad libitum* de huevos de *Ephestia kuehniella* (polilla de la harina) como alimento óptimo, judías verdes como fuente de humedad y sustrato para la puesta de huevos. Cada vez que se realizó, las judías que estaban en los botes de adultos se pusieron en botes nuevos para que los huevos eclosionaran y comenzara una nueva generación. En los botes donde hay ninfas se retiraron las judías más deshidratadas y se añadieron nuevas. La cría se mantuvo en condiciones controladas a 26 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ HR y régimen de luz L16: D8.

2.2 Ensayo de fecundidad

El objetivo de este ensayo fue conocer el número de huevos que podían depositar las hembras de esta población siendo alimentadas con distintos ácaros astigmátidos. Una vez que las ninfas de esta población estaban en el quinto estadio ninfal, eran controladas hasta que llegaban a ser adultos. Una vez pasado el tiempo necesario para la realización de la cópula, las hembras eran individualizadas en recipientes de 125 mL con tapa aireada que contenían un trozo de judía de aproximadamente 7 cm y la respectiva dieta *ad libitum* (40 hembras/dieta). Se utilizaron un total de 8 dietas, por un lado, la dieta óptima huevos de *E. kuehniella* que fue el control de nuestro ensayo y, por otro lado, 7 especies de ácaros astigmátidos: *Aleuroglyphus ovatus*, *Tyreophagus entomophagus*, *Carpoglyphus lactis*, *Tyrolichus casei*, *Suidasia medanensis*, *Leptoglyphus destructor* y *Acarus siro*.

Cada 2-3 días se añadió comida fresca y la judía era sustituida por una nueva hasta que la hembra moría, para poder conocer su fecundidad total. El número de huevos se contaba con la ayuda de una lupa estereoscópica. Este ensayo se realizó bajo las mismas condiciones que la cría de la población.

2.3 Análisis estadístico

La fecundidad de las hembras se analizó para observar posibles diferencias significativas entre las distintas dietas ofrecidas. Se realizó un análisis de varianza de un factor.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fig. 1 podemos observar los resultados de la fecundidad total media obtenida con los distintos ácaros utilizados. Existieron diferencias significativas en la fecundidad total entre las distintas presas ofrecidas ($F=19,85$; $g.l.=7/312$; $P=0.000$). La mejor fecundidad se dio con la dieta óptima *E. kuehniella* como era de esperar, alcanzando los 27 huevos de media. Entre las especies de ácaros astigmátidos la fecundidad se vio reducida un 63% (10 huevos) en los mejores casos (*C. lactis* y *T. entomophagus*) y la menor fecundidad se obtuvo con el ácaro *S. medanensis* que se redujo un 85% (4 huevos). Entre los ácaros *L. destructor*, *A. ovatus*, *A. siro* y *T. casei* no se dieron diferencias significativas, obteniéndose fecundidades cercanas a los 8 huevos.

En una reciente revisión donde se repasan los alimentos alternativos para los insectos depredadores de la familia Miridae, ni siquiera se mencionan los ácaros astigmátidos (5). No hemos encontrado ningún estudio publicado en el que se ensayen estos ácaros como alimento de ninguna especie de mírido depredador. Aunque observamos en nuestro estudio que cuando *M. pygmaeus* se alimenta con ácaros astigmátidos la cantidad de huevos que pone disminuye fuertemente, esta dieta permitiría el mantenimiento de la población en el cultivo en ausencia de presa. La reducción de la fecundidad para *M. pygmaeus* alimentado con *C. lactis* fue del 63%, menor que lo reportado para *Orius thripoborus* (75%) y para *O. naivashae* (100%) (4).

4. CONCLUSIONES

Existieron diferencias significativas en la fecundidad de *M. pygmaeus* alimentado de distintas especies de ácaros astigmátidos. Aunque los ácaros astigmátidos son un alimento subóptimo para *M. pygmaeus*, podrían utilizarse como alimento suplementario en el cultivo, ya que permiten la reproducción del depredador.

5. AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada por el proyecto PID2020-116897RB-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033. El contrato de M.C.R. PRE2021-100148 fue financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y FSE+. El contrato de C.G. fue financiado por el programa AGROALNEXT que ha sido financiado por MICIU con fondos NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la Fundación Séneca - Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia. El contrato de A.R.-G. fue cofinanciado por el Plan de Apoyo a la I+D+i de la Universidad Politécnica de Cartagena. El contrato de V. B. fue financiado por el proyecto PDC2021-121383-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea Next GenerationEU/ PRTR. El contrato de A.B.A. fue cofinanciado por la ayuda 21578/FPI/21 de la Fundación Séneca (Región de Murcia) y Agrobío.

6. REFERENCIAS

1. Van Lenteren, J.C.; Alomar, O.; Ravensberg, W.J.; Urbaneja, A. Biological Control Agents for Control of Pests in Greenhouses. In Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops; Plant Pathology in the 21st Century 9; Springer: Cham, Switzerland, 2020.
2. Mendoza, J.E.; Balanza, V.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. J. Pest Sci. 2020, 94, 729–742.
3. Perdakis, D., Lykouressis, D., 2004. *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) population parameters and biological characteristics when feeding on eggplant and tomato without prey. Journal of Economic Entomology 97, 1291–1298.
4. Bonte, J., Van de Walle, A., Conlong, D., & De Clercq, P. (2017). Eggs of *Ephesia kuehniella* and *Ceratitis capitata*, and motile stages of the astigmatid mites *Tyrophagus putrescentiae* and *Carpoglyphus lactis* as factitious foods for *Orius* spp. Insect science, 24(4), 613–622.
5. Pérez-Hedo, M., Riahi, C., & Urbaneja, A. (2021). Use of zoophytophagous mirid bugs in horticultural crops: current challenges and future perspectives. Pest Management Science, 77(1), 33–42.

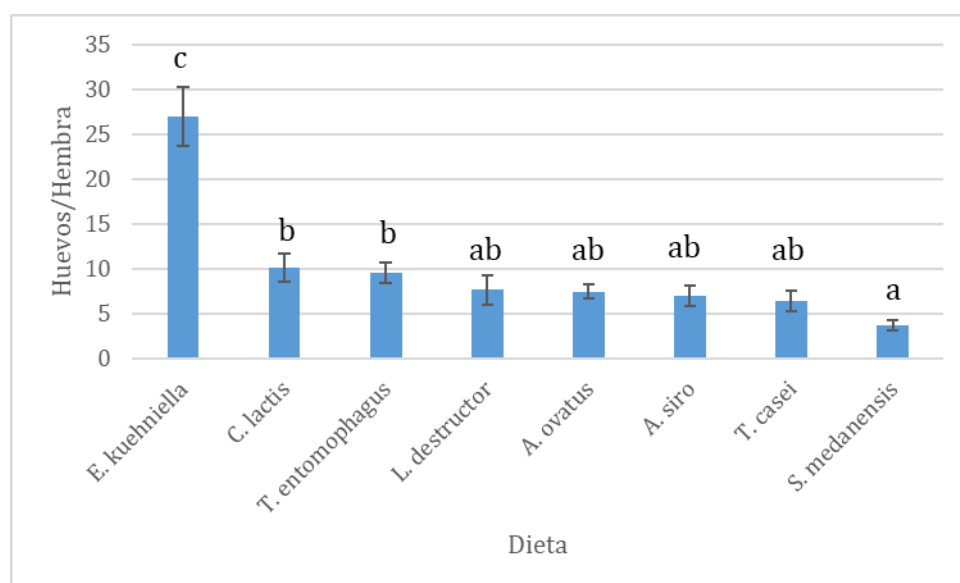


Figura 1. Fecundidad total media de *Macrolophus pygmaeus* alimentado con huevos de *Ephestia kuehniella* y diferentes especies de ácaros astigmátidos.

Optimizando el cultivo de verdolaga mediante intercropping y rotación con leguminosas: un estudio sobre la productividad y las comunidades bacterianas rizosféricas

Optimizing purslane cultivation through legume intercropping and crop rotation: a study on yield and rhizosphere bacterial communities

A. Carrascosa*¹, J.A. Pascual¹, M. Ros¹, J. Cuartero², A. DeSantiago³, S.A. Petropoulos⁴, M.M. Alguacil¹

¹Grupo de Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100, Espinardo, Murcia, España.

²Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research WSL, 8903, Birmensdorf, Switzerland.

³Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Área de Protección Vegetal, Subárea de gestión y usos de suelos agrícolas y forestales, Instituto de Investigación Finca la Orden, 06187, Badajoz, Spain.

⁴Departamento de Agricultura, Producción Agrícola y Medio Rural. Universidad de Tesalia. Calle Fytokou, 384 46, Volos, Grecia.

*a.carrascosa@cebas.csic.es

Resumen

El cultivo mixto con leguminosas es un sistema sostenible de cultivo que proporciona servicios agro-ecológicos y mejora el rendimiento de cultivos, principalmente debido a la capacidad de fijar nitrógeno por las leguminosas. En este estudio, evaluamos como la rotación y el intercropping con leguminosas afectaron al rendimiento de plantas de verdolaga y a la estructura y funcionalidad de las comunidades bacterianas de la rizosfera de verdolaga. Todos los tratamientos aumentaron el crecimiento de las plantas, sin embargo, solo los tratamientos de rotación y el combinado tuvieron un efecto en la rizosfera, aumentando la actividad enzimática y modificando la composición y funcionalidad bacteriana, promoviendo la abundancia de bacterias degradadoras de carbono y fijadoras de nitrógeno. Esto demuestra como los sistemas de cultivo mixtos pueden ser útiles para el cultivo sostenible de verdolaga y los posibles mecanismos biológicos responsables.

Palabras clave: *Portulaca oleracea*; Agricultura sostenible; 16S rRNA; Actividades enzimáticas.

Abstract

Mixed cropping with legumes is a sustainable farming system that provides agro-ecological services and enhances crop yield, mainly due to legumes' nitrogen-fixing capacity. In this study, we assessed how crop rotation and intercropping with legumes affected purslane yield and the structure and functionality of purslane rhizosphere bacterial communities. All treatments increased plant growth, however, only rotation and the combined treatment had an effect on the rhizosphere, enhancing enzymatic activity and modifying bacterial composition and functionality, promoting the abundance of carbon-degrading and nitrogen-fixing bacteria. These demonstrate how mixed cropping systems can be beneficial for sustainable purslane cultivation and the potential biological mechanisms involved.

Keywords: *Portulaca oleracea*; Sustainable agriculture; 16S rRNA; Enzyme activities.

1. INTRODUCCIÓN

La verdolaga es una planta salvaje comestible, conocida por sus propiedades nutricionales, siendo rica en ácidos grasos omega – 3 y en antioxidantes que está además bien adaptada a condiciones climáticas adversas como las altas temperaturas, y con bajos requerimientos hídricos y nutricionales (1) lo que la vuelve un cultivo de especial interés en regiones semiáridas del mediterráneo donde además de las condiciones climáticas, la contaminación del suelo y aguas por el uso abusivo de agro-químicos suponen un riesgo para el medio (2).

Los sistemas de cultivo mixtos que involucran el uso de leguminosas -que establecen relaciones simbióticas con bacterias del género *Rhizobium*, capaces de fijar nitrógeno atmosférico (3)- en sistemas de rotación o intercropping que recientemente se están proponiendo como una alternativa frente al monocultivo convencional como forma de reducir el uso de fertilizantes y de optimizar los recursos, mejorando el rendimiento de los cultivos mediante la mejora de la fertilidad del suelo y cambios en la comunidad microbiana de la rizosfera (4,5).

En sistemas de rotación, la mayor parte del nitrógeno fijado es asimilado por la leguminosa y quedará disponible para el cultivo posterior tras la degradación de los restos de la leguminosa, mientras que, en el intercropping, el nitrógeno fijado puede ser asimilado inmediatamente por el cultivo asociado (6,7). Ambos sistemas también son capaces de mejorar la fertilidad del suelo a través de la producción de exudados radiculares facilitando la proliferación de bacterias promotoras del crecimiento que aumenten la mineralización de la materia orgánica o la disponibilidad de nutrientes como el fósforo o el potasio (8).

El objetivo de nuestro estudio es estudiar como un cultivo de bajo mantenimiento como la verdolaga se puede ver beneficiado por la rotación de cultivos o el intercropping, enfocándose en los cambios de la actividad, estructura y funcionalidad de las comunidades bacterianas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

El experimento se realizó en condiciones de campo en la finca experimental del CEBAS -CSIC (Santomera, Murcia) entre enero y agosto del año 2022. Consistió en cuatro tratamientos: Verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) en monocultivo durante el verano (Control); (ii) Intercropping de verdolaga y caupí (*Vigna unguiculata* L.) en verano (I); (iii) Rotación de verdolaga cultivada en verano y guisantes (*Pisum sativum* L.) cultivados en el invierno anterior y que una vez cosechados, se secaron y se incorporaron al suelo (R); y (iv) un sistema mixto donde se combinaron los tratamientos de rotación e intercropping (IR). Se cultivaron 6 parcelas (n = 6) para cada tratamiento con un diseño totalmente aleatorio, donde se cultivaron 14 plantas, divididas en 2 filas de 7 plantas. En los tratamientos con caupí, se intercalaron filas de verdolaga y caupí. No se aplicaron fertilizantes y las plantas se regaron una vez por semana.

2.3 Parámetros físico – químicos

Se determinó la relación C/N, el Carbono Orgánico Total (TOC), pH y fósforo disponible (AP).

2.2 Parámetros biológicos

Se midió el peso de las plantas de verdolaga. Se determinaron las actividades enzimáticas β -glucosidasa, fosfatasa, ureasa y deshidrogenasa del suelo rizosférico. La comunidad bacteriana se estudió secuenciando la región V3-V4 del rRNA 16S del ADN total del suelo rizosférico. Las secuencias obtenidas se analizaron usando el pipeline bioinformático DADA2 usando la plataforma QIIME2. Las secuencias procesadas se compararon con la base de datos SILVA v.138.

2.4 Tratamiento estadístico

Los análisis estadísticos y su representación se realizaron en R v 4.1.2. Para las variables físico químicas, biomasa, actividades enzimáticas y abundancias de grupos taxonómicos se

comprobó si los datos cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad y se realizó un análisis de varianza ANOVA, en caso contrario, se realizó un test Kruskal-Wallis, seguidos de los test post-hoc Tukey's HSD o Dunn respectivamente. A partir de la distancia de Bray-Curtis de la composición de la comunidad, se realizó un análisis de redundancia (RDA) para visualizar la relación entre la comunidad microbiana y las propiedades del suelo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los tratamientos aumentaron significativamente la biomasa de la verdolaga respecto al control, entre un 34 y 54% (Fig. 1), esto probablemente debido a la alta respuesta de crecimiento de la verdolaga incluso a bajas concentraciones de nitrógeno (1). Sin embargo, solo en los tratamientos donde hubo rotación (R e IR) se vio afectada la comunidad microbiana con respecto al control (Fig. 2). Las propiedades del suelo que tuvieron un mayor impacto en la composición de la comunidad microbiana fueron las actividades enzimáticas, el AP y el TDW mostraron una correlación positiva con los tratamientos R e IR. Además, las familias *Rhizobiaceae*, *Myxococcaceae*, *Bacillaceae* o *Planococcaceae* entre otras fueron asociadas positivamente con la rotación. La familia *Rhizobiaceae* contiene bacterias responsables de la fijación de nitrógeno, relacionado directamente con el cultivo de guisantes previo a la verdolaga (9). Mientras que el resto de familias podrían estar relacionadas con la mineralización de los residuos de guisante incorporados al suelo, mejorando la disponibilidad de nutrientes (10). Sin embargo, aunque el tratamiento I por sí solo no causara efectos en la rizosfera de verdolaga, el mayor rendimiento de las plantas indica que el intercropping también podría haber mejorado la fertilidad del suelo.

4. CONCLUSIONES

Nuestro estudio muestra como un cultivo de bajo mantenimiento como la verdolaga aumentó su producción notablemente sin necesidad de fertilización usando sistemas de cultivo sostenibles como el intercropping y la rotación con leguminosas, aunque solo detectamos cambios en la rizosfera bajo los tratamientos de rotación. Esto indica que el alcance del efecto en el suelo de la leguminosa podría ser limitado, por lo que solo se detectaron en los puntos donde se cultivó previamente y se incorporaron sus restos al suelo.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PCI2020-112091) y fundación PRIMA, proyecto VALUEFARM (PRIMA/0009/2019).

6. REFERENCIAS

1. Carrascosa A, Pascual JA, Ros M, Petropoulos SA, Alguacil M del M. Agronomical Practices and Management for Commercial Cultivation of *Portulaca oleracea* as a Crop: A Review. *Plants* [Internet]. 2023 Mar 9;12(6):1246. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/6/1246>
2. Cui M, Zeng L, Qin W, Feng J. Measures for reducing nitrate leaching in orchards: A review. *Environmental Pollution*. 2020 Aug;263:114553.
3. Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* [Internet]. 2008 Oct 11;311(1-2):1-18. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-008-9668-3>
4. Angon PB, Anjum N, Akter MstM, KC S, Suma RP, Jannat S. An Overview of the Impact of Tillage and Cropping Systems on Soil Health in Agricultural Practices. Xiao X, editor. *Advances in Agriculture* [Internet]. 2023 May 27;2023:1-14. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/aag/2023/8861216/>
5. Martin-Guay MO, Paquette A, Dupras J, Rivest D. The new Green Revolution: Sustainable intensification of agriculture by intercropping. *Science of the Total Environment*. 2018 Feb 15;615:767-72.
6. Thilakarathna MS, McElroy MS, Chapagain T, Papadopoulos YA, Raizada MN. Belowground nitrogen transfer from legumes to non-legumes under managed herbaceous cropping systems. A review. *Agron Sustain Dev*. 2016 Dec 1;36(4).
7. Duchene O, Vian JF, Celette F. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agric Ecosyst Environ*. 2017 Mar 1;240:148-61.

8. Chamkhi I, Cheto S, Geistlinger J, Zeroual Y, Kouisni L, Bargaz A, et al. Legume-based intercropping systems promote beneficial rhizobacterial community and crop yield under stressing conditions. *Ind Crops Prod.* 2022 Sep 1;183.
9. Carareto Alves LM, de Souza JAM, Varani A de M, Lemos EG de M. The Family Rhizobiaceae. In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 419–37.
10. Silva AMM, Estrada-Bonilla GA, Lopes CM, Matteoli FP, Cotta SR, Feiler HP, et al. Does Organomineral Fertilizer Combined with Phosphate-Solubilizing Bacteria in Sugarcane Modulate Soil Microbial Community and Functions? *Microb Ecol.* 2022 Aug 1;84(2):539–55.

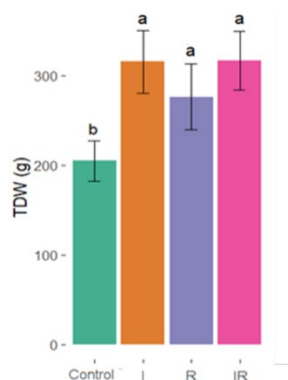


Figura 1. Peso Seco Total (TDW) de las plantas de verdolaga bajo los distintos tratamientos. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0.05$) según el test Tukey's HSD.

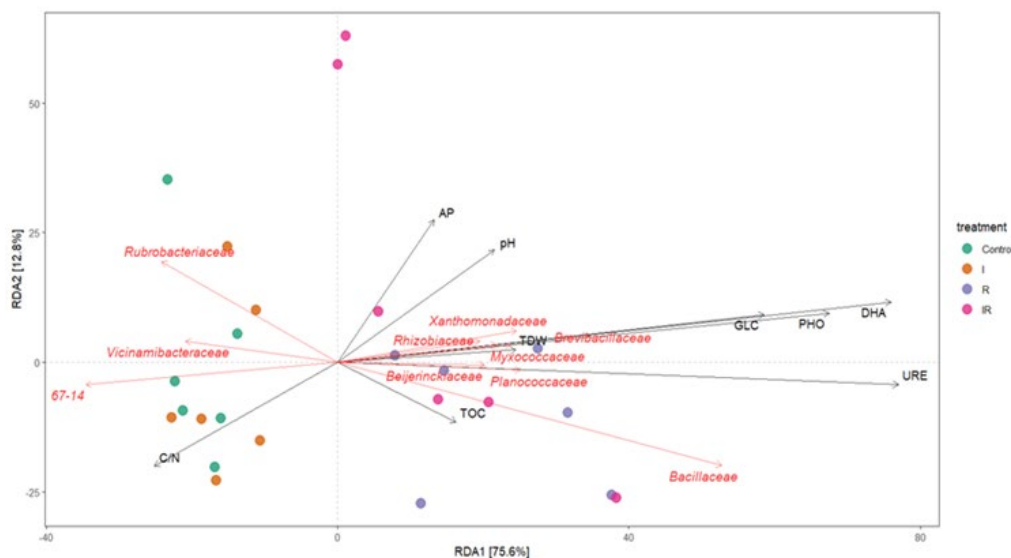


Figura 2. Análisis de redundancia (RDA) entre la comunidad bacteriana a nivel de familia y los factores ambientales.

Regulación del metabolismo de la sacarosa en frutos de plantas de pimiento sometidas a estrés salino mediada por el uso de malla foselectiva roja

Regulation of sucrose metabolism in fruits of pepper plants subjected to salt stress mediated by the use of red photoselective mesh

A. Gálvez^{*1}, A. Albacete², F. M del Amor¹, J. López-Marín¹

¹Departamento de Producción Vegetal y Agrotecnología. IMIDA.C/Mayor s/n, 30012, La Alberca, Murcia, España.

²Departamento de Nutrición Vegetal. CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*1297@coitarm.es

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del uso de malla foselectiva roja en la mejora de la regulación del metabolismo de la sacarosa en frutos de plantas de pimiento sometidos a estrés salino. En condiciones de sombreo y salinidad, se produce una menor acumulación de fructosa, sacarosa y hexosas lo que podría indicar un aumento de la hidrólisis en el fruto mediada por el uso de la malla foselectiva, lo que está apoyado por los mayores valores obtenidos en el índice de hidrólisis. Con respecto a las proteínas totales, se observa una acumulación de las mismas en los tratamientos de sombreo, tanto en condiciones control como de salinidad, lo que podría estar relacionado con el uso de la malla foselectiva. Por tanto, el uso de mallas foselectivas rojas, podría ser una buena estrategia para la regulación del metabolismo de la sacarosa en condiciones de salinidad.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L.; foselectividad; salinidad; relaciones fuente-sumidero.

Abstract

The objective of this work was to study the effect of using red photoselective mesh on improving the regulation of sucrose metabolism in fruits of pepper plants subjected to salt stress. Under shade and salinity conditions, there is a lower accumulation of fructose, sucrose and hexoses, which could indicate an increase in hydrolysis in the fruit mediated by the use of the photoselective mesh, which is supported by the higher values obtained in the hydrolysis rate. With respect to total proteins, an accumulation of them is observed in the shade treatments, both in control and salinity conditions, which could be related to the use of the photoselective mesh. Therefore, the use of red photoselective meshes could be a good strategy for regulating sucrose metabolism under salinity conditions.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; photoselectivity; salinity; sink-source relationships.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas se desarrollan en ambientes versátiles que con frecuencia presentan condiciones desfavorables y estresantes para su crecimiento. Estas condiciones ambientales incluyen estrés biótico causado por patógenos o plagas, así como estrés abiótico, como sequía, temperaturas extremas, exceso de sal, presencia de metales tóxicos y deficiencia de nutrientes. De hecho, la salinidad es una de las restricciones abióticas más significativas en áreas áridas y semiáridas (1). Este tipo de estrés, tiene efectos osmóticos e iónicos en las plantas, con unos efectos adversos complejos entre los que se incluyen estrés oxidativo, daño en los componentes

celulares y disfunción metabólica. Durante el estrés salino, los aspectos morfológicos, fisiológicos y moleculares de las plantas se ven afectados negativamente, lo que reduce su crecimiento y desarrollo y limita su productividad (2,3).

Un enfoque eficiente para gestionar la radiación solar y que se ha demostrado que mejora la producción de los cultivos es el uso de innovadoras mallas de sombreo con propiedades ópticas que alteran tanto la cantidad como la calidad de la luz interceptada, además de proporcionar la protección deseada (4,5). Las mallas de sombreo de colores provocan una estimulación diferencial de algunos procesos fisiológicos que están regulados directamente por la luz, como la fotosíntesis y la fotomorfogénesis, y, por tanto, influyen en la producción de fotoasimilados. La hidrólisis de sacarosa hacia glucosa y fructosa y su balance en los órganos sumidero juega un papel fundamental en la regulación de las relaciones fuente-sumidero en condiciones de estrés, ya que determina la capacidad de importar fotoasimilados para mantener el aporte de energía (6). Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio del uso de malla fotoselectiva roja en la mejora de la regulación del metabolismo de la sacarosa en plantas de pimiento sometidas a estrés salino.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones del cultivo

Se evaluaron plantas de pimiento de la variedad comercial 'Gacela' 'F1' (Syngenta Seeds, USA). Las plantas se distribuyeron en un invernadero multitúnel separadas 100 cm entre filas y 40 cm entre plantas y se cultivaron individualmente en macetas de 20 L. El tratamiento de salinidad se inició 15 días después del trasplante, añadiendo NaCl a la solución nutritiva Hoagland estándar hasta llegar a una concentración final de 35 mM, mientras que las plantas control se regaron con la solución nutritiva original durante todo el ensayo. En el momento de la aplicación del tratamiento de salinidad, parte del área del ensayo dentro del invernadero, se cubrió con una malla roja (tipo ChromatiNet Raschel, 30% de sombreado, Polysack Plastic Industries LTD, Nir-Yitzak, Israel) colocada a 50cm sobre la canopia de las plantas, moviéndose periódicamente en relación con el crecimiento de las plantas. El área cubierta con la malla roja reclusa la mitad de las plantas sometidas a riego óptimo de nutrientes y la mitad de las plantas salinizadas.

2.2 Determinación de carbohidratos y proteínas totales

La concentración de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) se determinó usando la metodología descrita por (7) con algunas modificaciones. La extracción de azúcares de las muestras de fruto se realizó mediante extracción en fase sólida, utilizando un tampón metabólico. Para el análisis se empleó cromatografía iónica utilizando un sistema 817 Bioscan (Metrohm, Herisau, Suiza) equipado con un detector amperométrico de pulso (PAD) y un electrodo de oro. La separación cromatográfica se realizó en una columna METROHM Metrosep Carb 1-150 IC (4,6 × 250 mm), termostatzada a 32 °C. Las actividades sacarolíticas se evaluaron mediante la determinación del NADH producido en una reacción enzimática acoplada utilizando sustratos/enzimas específicos según la enzima objetivo, con base en el protocolo descrito por (8) con algunas modificaciones. La extracción se realiza a partir de 0,1 g de la muestra congelada y triturada. Se adiciona 1 mL de tampón de extracción (DTT, Tritón x100 0,02%, etilenglicol 10%, HEPES 50 mM, MgCl₂·6H₂O 10 mM, EDTA·2H₂O 0,1 mM, pH ajustado a 7 con KOH 5N). Se agita en vórtex durante 30s y se incuba en hielo y oscuridad durante 30 minutos, con una agitación en el vórtex de 30s cada 10 minutos. En total, se agita en vórtex cuatro veces en intervalos de 10 minutos (t = 0min, t = 10min, t = 20min, t = 30min). Tras la incubación, se centrifugan las muestras a 11.000 rpm durante 10 minutos manteniendo la temperatura a 4°C. El sobrenadante de la muestra centrifugada contiene la fracción proteica soluble, mientras en el precipitado queda la fracción proteica insoluble. Las proteínas insolubles son extraídas del precipitado modificando la disolución extractante con NaCl. Finalmente, las muestras fueron analizadas por espectrofotometría UV-visible (Shimadzu UV-1800 ultraviolet-visible spectrophotometer) aplicando el método colorimétrico de Bradford y midiendo la absorbancia a 595 nm. Para el

método de Bradford, se preparó una recta de calibrado con albúmina de suero bovino (BSA) 2 mg/mL en un rango de concentraciones de 1 a 20 µg/mL.

2.3 Tratamiento estadístico

Los valores medios de las distintas combinaciones de malla de sombreo y del tratamiento salino se compararon utilizando el test Tukey con $P \leq 0,05$, utilizando el software SPSS para Windows (Versión 25.0, SPPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de glucosa analizadas, tanto en condiciones control como salinas, fueron superiores en los tratamientos cubiertos con malla fotoselectiva roja, aunque sin diferencias significativas (Figura 1a). Con respecto a la fructosa, aun no encontrándose diferencias significativas entre tratamientos, se observó una ligera reducción, sobre todo en las plantas salinizadas y cubiertas con malla, lo que indica un mayor uso (Figura 1b). La disminución generalizada de las concentraciones de fructosa por efecto del estrés salino podría explicar su papel en procesos globales de respuesta al estrés(9). Las concentraciones de hexosas totales (glucosa + fructosa) también se redujeron sensiblemente, lo que sugiere un mayor gasto en condiciones de salinidad y sombreo (Figura 1d). La reducción significativa de las concentraciones de hexosas parece estar asociada a respuestas específicas de activación del metabolismo en procesos de mantenimiento del crecimiento de los órganos sumidero en condiciones de estrés (7). Las concentraciones de sacarosa disminuyeron en las dos condiciones de salinidad en las plantas cubiertas con malla, lo que podría indicar un aumento de la hidrólisis de la sacarosa en el fruto (Figura 1c). La concentración de sacarosa en los tejidos vegetales parece estar directamente relacionada con la intensidad de la luz e inversamente relacionada con la temperatura(10). El principal determinante del rendimiento de los cultivos es la tasa acumulativa de fotosíntesis durante la temporada de crecimiento, que está regulada por la cantidad de luz capturada y su capacidad para utilizar eficientemente la energía para convertir el CO₂ en biomasa y el rendimiento cosechable almacenado como carbohidratos. El índice de hidrólisis de sacarosa alcanza los mayores valores en el tratamiento cubierto con malla fotoselectiva roja y salinizado, lo que presupone un mejor mantenimiento del metabolismo de la sacarosa (Figura 1f). Con respecto a las proteínas totales, se observó una acumulación de las mismas en los tratamientos de sombreo, tanto en condiciones control como de salinidad, pero este aumento es significativo y bastante importante en condiciones de salinidad, lo que podría estar relacionado con el uso de la malla fotoselectiva roja.

4. CONCLUSIONES

Las mallas fotoselectivas rojas indujeron un aumento de la hidrólisis de la sacarosa en los frutos de plantas de pimiento salinizadas, lo cual puede estar relacionado con un mejor mantenimiento del metabolismo de la sacarosa en condiciones de salinidad, que redundaría en una mayor productividad.

5. REFERENCIAS

1. Ashraf M, Harris PJC. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 2004 Jan 1;166(1):3–16.
2. Dajic Z. Salt stress. In: *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer; 2006. p. 41–99.
3. Munns R, Gilliam M. Salinity tolerance of crops—what is the cost? *New phytologist*. 2015;208(3):668–73.
4. López-Marín J, Gálvez A, Otálora G, Del Amor F. Photoselective shade nets for pepper cultivation in southeastern Spain. *Acta Hort*. 2019 Sep 1;183–90.
5. Ilić Z, Milenković L, Đurovka M, Kapoulas N. The effect of color shade nets on the greenhouse climate and pepper yield. In: *Proceedings of the 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture, Opatija Croatia*. 2011. p. 529–32.

6. Poljakoff-Mayber A, Lerner H. Plants in saline environments. Crop PM (ed) H of P and, Stress, editors. New York; 1994. 65–96 p.
7. Albacete A, Cantero-Navarro E, Großkinsky DK, Arias CL, Encarnación Balibrea M, Bru R, et al. Ectopic overexpression of the cell wall invertase gene CIN1 leads to dehydration avoidance in tomato. J Exp Bot. 2015;66(3):863–78.
8. Balibrea ME, Cuartero J, Bolarín MC, Pérez-Alfocea F. Sucrolytic activities during fruit development of Lycopersicon genotypes differing in tolerance to salinity. Physiol Plant. 2003;118(1):38–46.
9. Du ZK, Hu YF, Li JM. Overexpression of a gene AhFBA from Arachis hypogaea confers salinity stress tolerance in Escherichia coli and tobacco. Biol Plant. 2019 Jan 19;63(1):122–33.
10. Winter H, Huber SC. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and regulation of Activity of Key Enzymes. CRC Crit Rev Plant Sci. 2000;19(1):31–67.

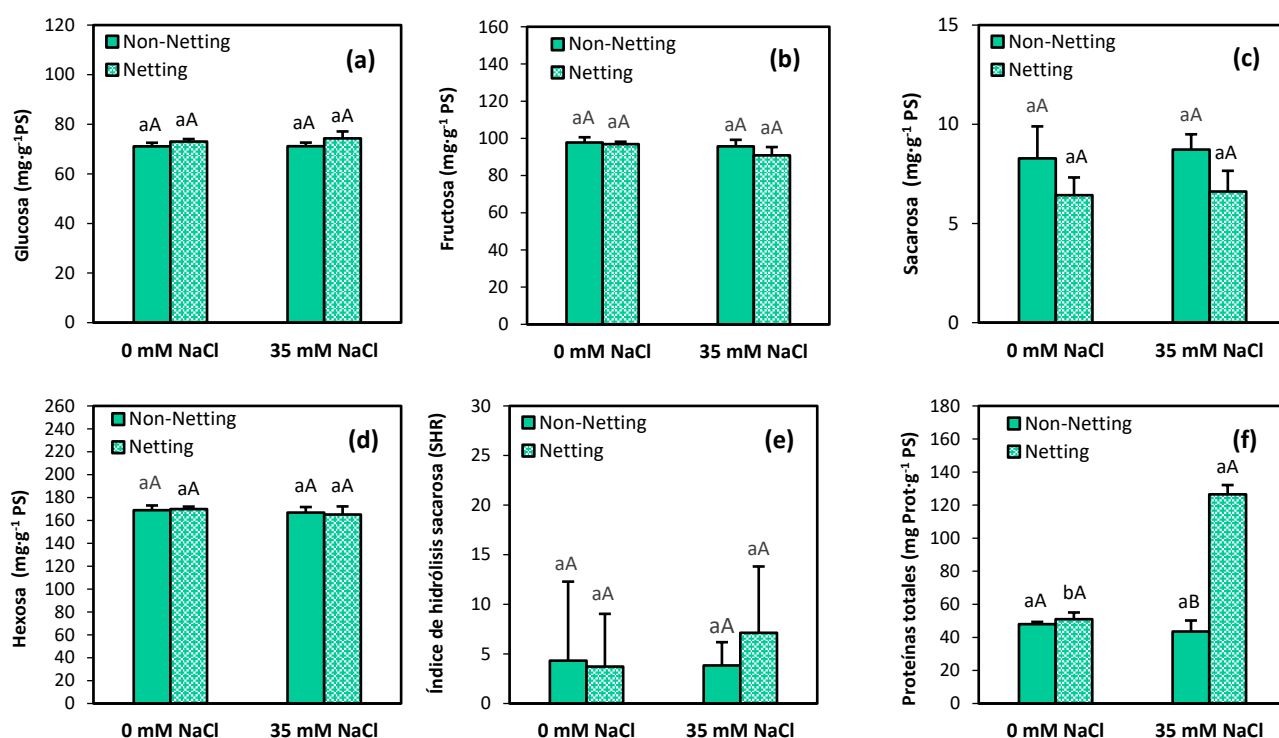


Figura 1. Concentraciones de (a) glucosa, (b) fructosa, (c) sacarosa, (d) hexosa, (e) índice de hidrólisis de sacarosa y (f) proteínas totales en frutos de plantas de pimienta de la variedad comercial ‘Gacela F1’ cultivadas en condiciones control (0 mM NaCl) y salinas (35 mM NaCl). Las barras muestran la media de 5 plantas $\pm$ error estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas debido al tratamiento de cubierta, mientras que letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas debidas al tratamiento salino de acuerdo con el test Tukey ($P \leq 0,05$).

Ecoeficiencia de un sistema de cultivo en cascada Ecoefficiency of a Cascade Cropping System

F. Amoruso^{1*}, M.D. De-Miguel², A. Signore¹, V.M. Gallegos-Cedillo¹, P.A. Gómez-Di Marco³, J. Ochoa¹, J.A. Fernández¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Economía de la Empresa. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

³Instituto de Biotecnología Vegetal. Edificio I+D+I. Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar, 30202, Cartagena, Murcia, España.

*fabio.amoruso@upct.es

Resumen

Este estudio examina el efecto de un sistema hortícola en cascada (SCC) utilizando rúcula [*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.] como cultivo principal e hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) como secundario. El drenaje recolectado ha sido utilizado como solución nutritiva en el hinojo marino en un sistema flotante, idóneo por su tolerancia a la salinidad. Para la obtención de los costes de producción se ha seguido el modelo del esquema de presupuesto empresarial, que se compone de costes variables, fijos y de oportunidad. La suma de ellos fija los umbrales de ganancia y de beneficios. La viabilidad y la rentabilidad del proyecto se evalúan utilizando los criterios del VAN, TIR, Pay-back y relación VAN/K₀. Tras su análisis se confirma que este sistema de cultivo es una inversión sólida con alta rentabilidad, con lo que hay una generación de empleo y un desarrollo sostenible por ahorro de agua y reutilización de inputs.

Palabras clave: Hinojo marino; rúcula; sistemas de cultivo en cascada; sostenibilidad.

Abstract

This study examines the effect of a cascade cropping system using rocket crop (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC) as the main crop and sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) as the secondary crop. The collected leachate has been utilized as a nutrient solution for sea fennel in a floating system, ideal for its salinity tolerance. Production costs were determined using a business budget scheme, comprising variable, fixed, and opportunity costs, setting the thresholds for profit and benefits. The project's viability and profitability are assessed using NPV, IRR, Payback, and the VAN/K₀ ratio. Following analysis, it is confirmed that this cropping system is a solid investment with high profitability, contributing to job creation and sustainable development through water savings and input reuse.

Keywords: Cascade cropping systems; rocket; sea fennel; sustainability.

1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático ha afectado significativamente a la agricultura tradicional, provocando fenómenos meteorológicos extremos y perturbando la seguridad alimentaria mundial (1). En entornos áridos, con escasez de agua y pobres en nutrientes, como son los de la costa de los países mediterráneos, los sistemas cerrados de cultivo sin suelo y, en particular, los sistemas de cultivo en cascada (SCC) son particularmente interesantes (2), ya que permiten crear circularidad y eficiencia de los recursos. El SCC necesita dos características principales: una combinación

adecuada de cultivos para reducir los aportes de agua y nutrientes y, encontrar un cultivo secundario tolerante a la sal (3). La halófita comestible hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) se puede cultivar hidropónicamente en una solución de nutrientes salinos, mejorando la calidad del producto fresco y la vida útil postcosecha como un vegetal “listo para comer”. Esto hace que sea un buen candidato como cultivo secundario (4). Por lo tanto, este estudio pretende contribuir a la literatura existente proporcionando información sobre el impacto de un SCC en las dimensiones de sostenibilidad económica, social y medioambiental.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento de los cultivos

La siguiente experiencia se llevó a cabo en la Estación Experimental Agroalimentaria de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT; lat. 37°41' N; long. 0°57' O). Las plántulas de rúcula [*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.], cv. “Apollo” se trasplantaron en canaletas metálicas (3 marzo 2022), rellenas de compost agroindustrial como medio de cultivo. Después del trasplante, se aplicó diariamente solución nutritiva (SN) con la siguiente composición: 7,2 mM NO₃⁻, 4,8 mM NH₄⁺, 2 mM H₂PO₄⁻, 2,5 mM SO₄²⁻, 6 mM K⁺, 1,9mM Ca²⁺ y 1,5 mM Mg²⁺ más una solución comercial de microelementos Nutromix® (2mg L⁻¹) y Sequestrene® G100 Syngenta (un quelato de hierro al 6% - 1,5 mg L⁻¹). Además, los lixiviados del medio de cultivo se recogieron en un tanque.

La siembra de hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) se realizó el 4 de mayo (2022) de forma manual en bandejas de poliestireno rellenas de turba, y colocadas en mesa de flotación lleno de agua de lluvia con una CE de 0,52 dS·m⁻¹. Un mes después de la siembra, las mesas se llenaron con 230 litros de solución nutritiva (SN). El tratamiento fue el siguiente: mezcla de drenaje de turba y SN (50%/50%). La cosecha se realizó el 18 de julio.

2.2 Análisis económico y de rentabilidad

Para la determinación de los costes de producción y rentabilidad del cultivo en cascada, se ha elegido el cultivo de la rúcula en sustrato de compost agroindustrial y el hinojo marino cultivado en la solución nutritiva especificada en el apartado de material vegetal. Los datos obtenidos de la experiencia se han escalado a un invernadero de pequeña dimensión (16x9.5 metros). La metodología de costes que se ha utilizado es la del modelo del esquema de presupuesto empresarial, en el que los costes totales se consideran integrados por los costes variables, los costes fijos y los costes de oportunidad. La suma de los tres componentes fija el umbral de beneficio (tabla 1 y figura 1) (5). Para la determinación de la viabilidad y rentabilidad se definen los parámetros: pago de la inversión, vida del proyecto y flujos de caja (figura 2), y para el análisis de esta inversión se han utilizado los criterios del VAN (ganancia bruta obtenida), que mide la viabilidad del proyecto si el resultado es positivo, y el TIR, que mide la rentabilidad que proporciona el propio proyecto. El plazo de tiempo que se tarda en recuperar la inversión se determinó con el criterio del Pay-back, y la ganancia relativa obtenida de cada euro invertido se definió a través de VAN/K₀, (K₀ = pago de la inversión) (figura 2).

2.3 Indicadores medioambientales y sociales

Los aspectos socioeconómicos y medioambientales se enfocaron en el uso de compost como sustrato para el cultivo de la rúcula, compuesto por residuos de zumo de tomate y pimiento (41%), residuos de puerro (43%) y residuos de viñedo (16%), alineándose con objetivos de la economía circular española. Además, se destacó la necesidad de mano de obra, asegurada por la alta ocupación en el sector agrario de la Región de Murcia, tanto en hombres como en mujeres, contribuyendo a abordar la falta de relevo generacional.

2.4 Tratamiento estadístico

En el invernadero se utilizó un diseño de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones (mesas de flotación). Cada mesa tenía tres bandejas flotantes de 60 cm × 41 cm. Se

realizó un análisis de la varianza (ANOVA unidireccional). Los datos se analizaron con Statgraphics Centurion 19 (The Plains, VA, EE.UU.). La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey a $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre todos los elementos que componen los costes, caben destacar las materias primas y la mano de obra, que constituyen los costos variables (tabla 1 y figura 1), los cuales son de suma importancia. Al analizar estos cultivos, resulta evidente la necesidad de mano de obra para estos cultivos. En el caso específico de la rúcula, el uso del compost como sustrato no solo fomenta la reutilización de residuos, sino que también tiene un impacto ambiental positivo al impulsar la economía circular (6).

En la figura 2 se exponen los valores de los parámetros de la inversión: Pago de la Inversión (K_0) con un valor de 40.036,33 €, vida de la inversión (n) 25 años y los flujos de caja (R_j) de 9.800,60€ y los resultados de los cuatro criterios señalados: VAN, TIR, Pay-back y VAN/ K_0 , para un tipo de capitalización del 3.5%. Los resultados señalan que la inversión es viable, el VAN es positivo, y es rentable, el TIR proporciona un 18% de rentabilidad, la recuperación del dinero invertido se obtiene en el año 6, y la ganancia relativa es de 2.78€. Si la vida de la inversión se reduce a 15 años se comprueba que solo con la variación de este parámetro se produce una disminución significativa de la ganancia bruta y del resto de los criterios.

4. CONCLUSIONES

A nivel económico, se generan amplias oportunidades para optimizar los ingresos de las empresas agroalimentarias mediante el perfeccionamiento de la eficiencia en la gestión de sus recursos. Esta perspectiva conlleva, asimismo, beneficios de índole medioambiental al disminuir de forma significativa tanto la producción de residuos destinados a la disposición final como las emisiones de aguas residuales a nuestros cuerpos hídricos. Por último, pero no menos importante, este enfoque genera nuevos puestos de trabajo, mejora el estándar de vida de nuestra sociedad y promueve una mayor concienciación entre los consumidores hacia un consumo responsable y de proximidad.

5. AGRADECIMIENTOS

El trabajo se ha financiado mediante el Proyecto PID2020-114410RB-I00, del MCIN /AEI /10.13039 /501100011033, el Programa AGROALNEXT del MCIN con fondos NextGeneration EU (PRTR-C17JI) y la Fundación Séneca con fondos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

6. REFERENCIAS

1. Bebber, D. P., Ramotowski, M. A., Gurr, S. J. 2013. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature climate change*. 3(11), 985-988.
2. Santos MG, Moreira GS, Pereira R, Carvalho SMP. 2022 Assessing the potential use of drainage from open soilless production systems: A case study from an agronomic and ecotoxicological perspective. *Agric Water Manag.* 1;273.
3. Katsoulas N, Stanghellini C. 2019. Modelling crop transpiration in greenhouses: Different models for different applications. *Agronomy*. 9.
4. Amoruso, F., Signore, A., Gómez, P.A., Martínez-Ballesta, M.D.C., Giménez, A., Franco, J.A., Fernández, J.A., Egea-Gilabert, C. 2022. Effect of saline-Nutrient solution on Yield, Quality, and Shelf-Life of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) *Plants. Horticulturae*. 8, 127.
5. De-Miguel, M.D., Caballero, P.; Fernández-Zamudio, M.A 2020. Regresión o continuidad del sector citrícola Función de los costes. Capítulo 5. Del libro: Hoja de ruta para la citricultura española. Coordinadores: Garcia, J.M. y Moltó, E. Ed Cajamar. Caja Rural: 325 pp. SBN: 13-978-84-95531-49-0.
6. Barros, M. V., Salvador, R., de Francisco, A. C., Piekarski, C. M. 2020. Mapping of research lines on circular economy practices in agriculture: From waste to energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 131, 109958.

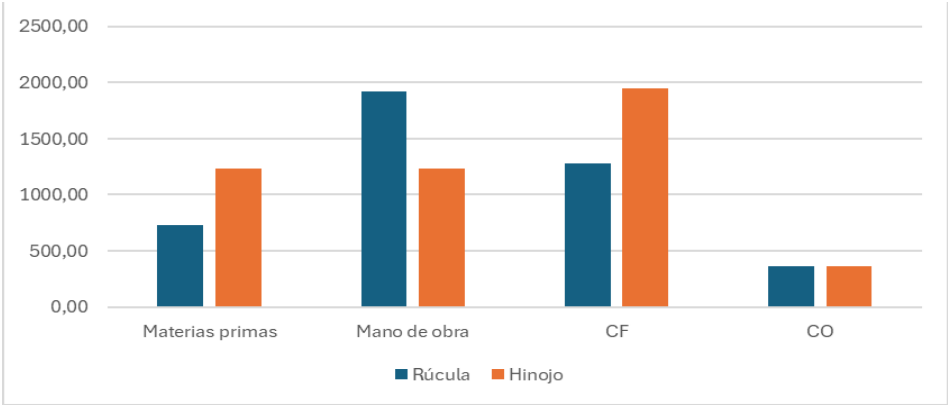


Figura 1. Comparativa de los costes de producción en cascada de la Rúcula y del Hinojo marino

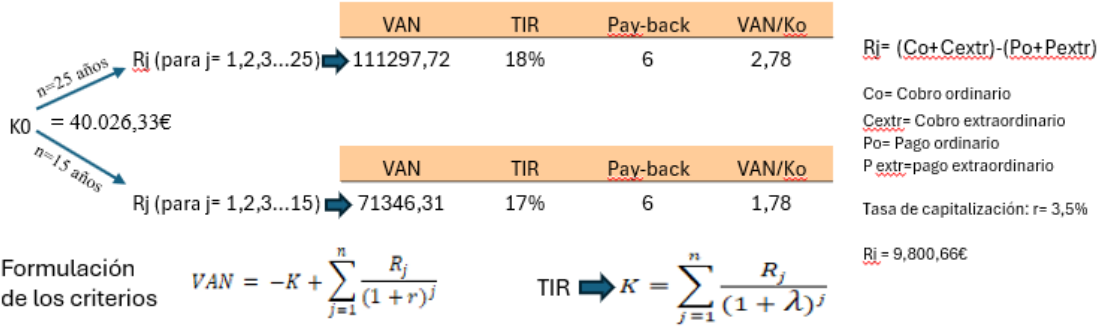


Figura 2. Parámetros, formulación de los criterios y resultados

Tabla 1 Costes de producción en cascada de rúcula e hinojo marino

	Rúcula	Hinojo
Invernadero de 16x 9,5 metros	Cultivo principal	Cultivo secundario
Producción total obtenida (gr/m²)	516,61	183,95
Costes de Producción (€/m²)		
1. Costes variables	17,43	16,27
2. Costes Fijos	8,45	12,85
Costes Totales (1+2)	25,88	29,12
3. Costes de oportunidad	2,39	2,38
Costes Totales (1+2+3)	28,27	31,49
Umbral de rentabilidad de la ganancia (€/gr)	0,050	0,16
Umbral de rentabilidad del Beneficio (€/gr)	0,055	0,17

Análisis estructural del sistema de drenaje de un lisímetro de pesada transportable

Structural analysis of the drainage system of a transportable weighing lysimeter

J.A. Nicolás-Cuevas^{*1}, M. Soler-Méndez¹, D. Parras-Burgos², J.M. Molina-Martínez¹

¹Grupo de Investigación de Ingeniería Agromótica y del Mar. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena, Murcia. España.

²Departamento de Estructuras, Construcción y Expresión Gráfica. Universidad Politécnica de Cartagena. C/ Doctor Fleming, s/n, 30202, Cartagena, Murcia. España.

*juan.nicolas@upct.es

Resumen

Esta comunicación analiza el diseño estructural del sistema de drenaje de un lisímetro de pesada transportable. Se destaca la importancia del diseño estructural para garantizar la precisión de las mediciones y cómo la estructura del sistema de drenaje puede manejar volúmenes de lixiviada sin comprometer su integridad. Se han analizado con SolidWorks Simulation los esfuerzos y las deformaciones de los recipientes del sistema de drenaje. Los resultados obtenidos permiten validar el diseño propuesto para el sistema de drenaje. Estos resultados proporcionan sugerencias para el diseño estructural de futuros sistemas de drenaje de lisímetros de pesada, considerando la importancia de mantener un equilibrio entre la eficacia del drenaje y las dimensiones del lisímetro.

Palabras clave: Agricultura de precisión; construcción; diseño; elementos finitos; lisimetría.

Abstract

This work discusses the structural design of a transportable weighing lysimeter's drainage system. The importance of structural design in ensuring accurate measurements is emphasized, and the ability of the drainage system's structure to manage leachate volumes without compromising its integrity. The stresses and strains experienced by the drainage system's vessels have been analyzed using SolidWorks Simulation. The results obtained from this analysis validate the design of the drainage system and provide recommendations for the structural design of future drainage systems for weighing lysimeters. These recommendations consider the need to maintain a balance between drainage efficiency and lysimeter dimensions.

Keywords: Construction; design; finite elements; lysimetry; precision agriculture.

1. INTRODUCCIÓN

Los lisímetros son dispositivos que aíslan una sección de suelo del entorno circundante, permitiendo el control y la medición de los distintos elementos que conforman el balance hídrico (1). En el caso de los lisímetros de pesada, las variaciones en la cantidad de agua se determinan a través de los cambios en el peso del recipiente que contiene el suelo. En la actualidad, el campo de la agronomía dispone de una amplia gama de métodos y herramientas para calcular el peso de los cultivos, los cuales se caracterizan por su diversidad en términos de modelos, funcionamiento y costos (2–4).

En la presente comunicación, se exponen la modelización y análisis estructural del sistema de drenaje de un lisímetro de pesada transportable.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema de drenaje del lisímetro de pesada (Fig. 1) está compuesto por un depósito de drenaje, una arqueta de drenaje y un depósito de muestreo (Fig. 2). El depósito de drenaje está situado debajo del recipiente del cultivo, recogiendo el agua lixiviada procedente de dicho recipiente. El agua recogida pasa previamente por un filtro de decantación que reduce el contenido de finos. Esta agua llega al depósito de drenaje que cuelga de una célula de carga de la estructura principal. Con este sistema de pesaje se mide cualquier alteración en el volumen contenido en el depósito [4]. Cuando el depósito de drenaje alcanza el nivel de evacuación, se activa la electroválvula inferior y el agua es expulsada a la arqueta de drenaje. Ante la necesidad de obtener muestras del agua lixiviada del depósito de muestreo para su posterior análisis, se incorporó un depósito de muestreo.

La arqueta de drenaje está formada por chapas acero, siendo sus dimensiones totales de 494 x 404 x 220 mm. La chapa está troquelada en la base para permitir la salida del agua. El depósito de drenaje tiene unas dimensiones de 360x160x 115 mm. Para la construcción de los recipientes se han utilizado chapas de acero inoxidable AISI 304 de espesor 2 mm cuyas deformaciones no deben interferir entre ellos para asegurar el adecuado funcionamiento del sistema de pesada.

Se ha efectuado un análisis estático para determinar las tensiones y las deformaciones que se producen en las paredes de los recipientes. Se analiza el efecto del terreno circundante sobre la arqueta de agua drenada y la presión hidrostática del agua sobre el depósito de drenaje. Para establecer las condiciones de contorno se ha considerado que el depósito de drenaje está suspendido de la célula de carga a través de un vástago roscado.

Se ha considerado una densidad húmeda para terrenos del tipo arena densa de 2.12 T/m³ (20,79 kN/m³) sobre la arqueta de drenaje. El programa de diseño asistido por ordenador utilizado ha sido SolidWorks.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis y simulaciones realizadas con SolidWorks Simulation indican que las deformaciones de la arqueta de drenaje (Fig. 3) y del depósito de drenaje (Fig. 4) no superan las holguras fijadas entre ellos, bajo las diferentes situaciones de carga. Las deformaciones obtenidas son pequeñas, siendo la máxima de 0,2 mm en el centro de la arqueta y de 0,27 mm en el depósito de drenaje.

4. CONCLUSIONES

El diseño de sistema de drenaje propuesto para el lisímetro de pesada permite la obtención un modelo compacto y adecuado a las necesidades funcionales definidas en el proceso, sin interferencias entre los componentes.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) para la realización de proyectos de investigación. Referencia: AGL2015-66938-C2-1-R.

6. REFERENCIAS

1. Allen RG. Evapotranspiración del cultivo: guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. FAO; 2006. (Estudio FAO riego y drenaje).
2. Meissner R, Rupp H, Seyfarth M. Advanced Technologies in Lysimetry. In: Mueller L, Saparov A, Lischeid G, editors. Novel Measurement and Assessment Tools for Monitoring and Management of Land and Water Resources in Agricultural Landscapes of Central Asia. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 159–73.

3. Meissner R, Rupp H, Weller U, Vogel HJ, Manfred S. Lysimeter research in Europe-technological developments and research strategies. 19th World Congr Soil Sci Soil Solut a Chang World. 2010;(August):40–3.
4. González-Esquiva JM, García-Mateos G, Escarabajal-Henarejos D, Hernández-Hernández JL, Ruiz-Canales A, Molina-Martínez JM. A new model for water balance estimation on lettuce crops using effective diameter obtained with image analysis. Agric Water Manag. 2017;183:116–22.

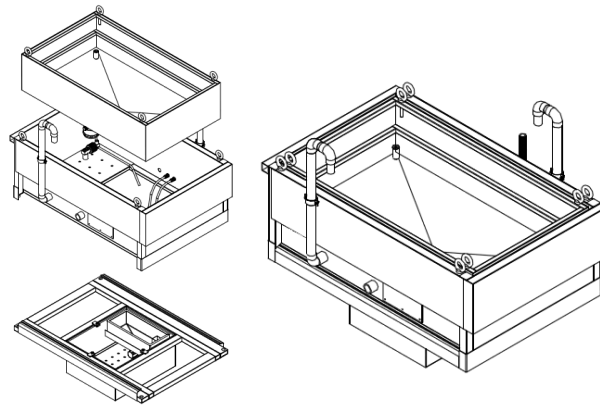
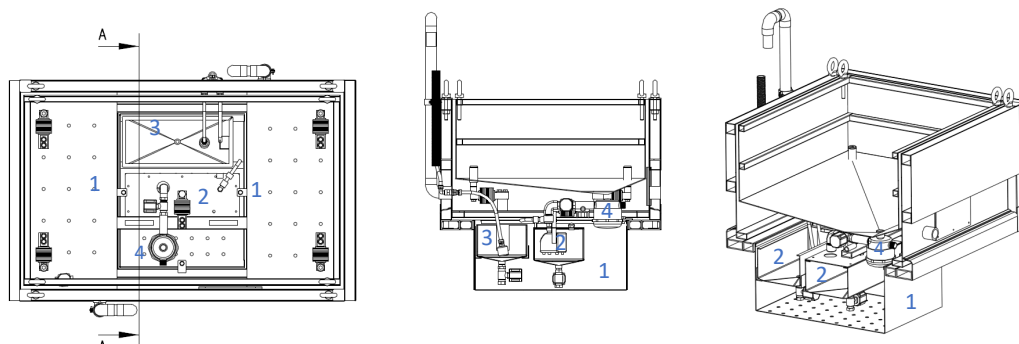


Figura 1. Vista explosionada y de conjunto del lisímetro de pesada.



Leyenda: 1 Arqueta de drenaje; 2 Depósito de drenaje; 3 Depósito de muestreo; 4 Filtro decantación

Figura 2. Vista en planta del modelo (izqda.), en sección (centro) y perspectiva (dcha.).

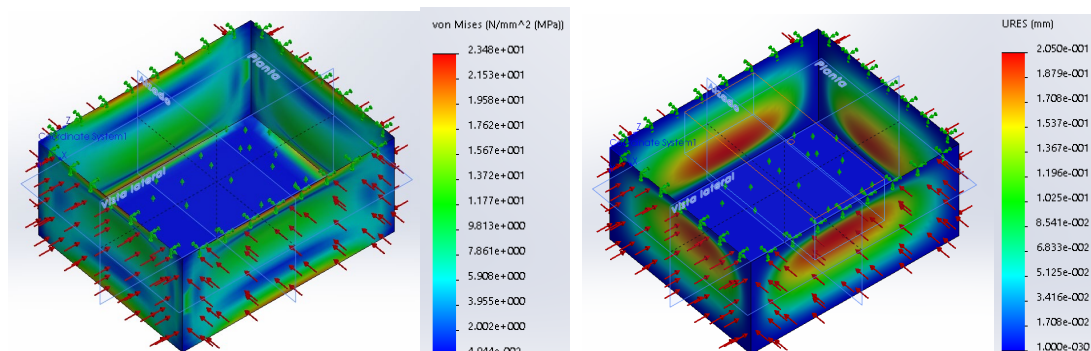


Figura 3. Arqueta de drenaje. Tensiones equivalentes de Von Mises (MPa) y desplazamientos verticales (mm).

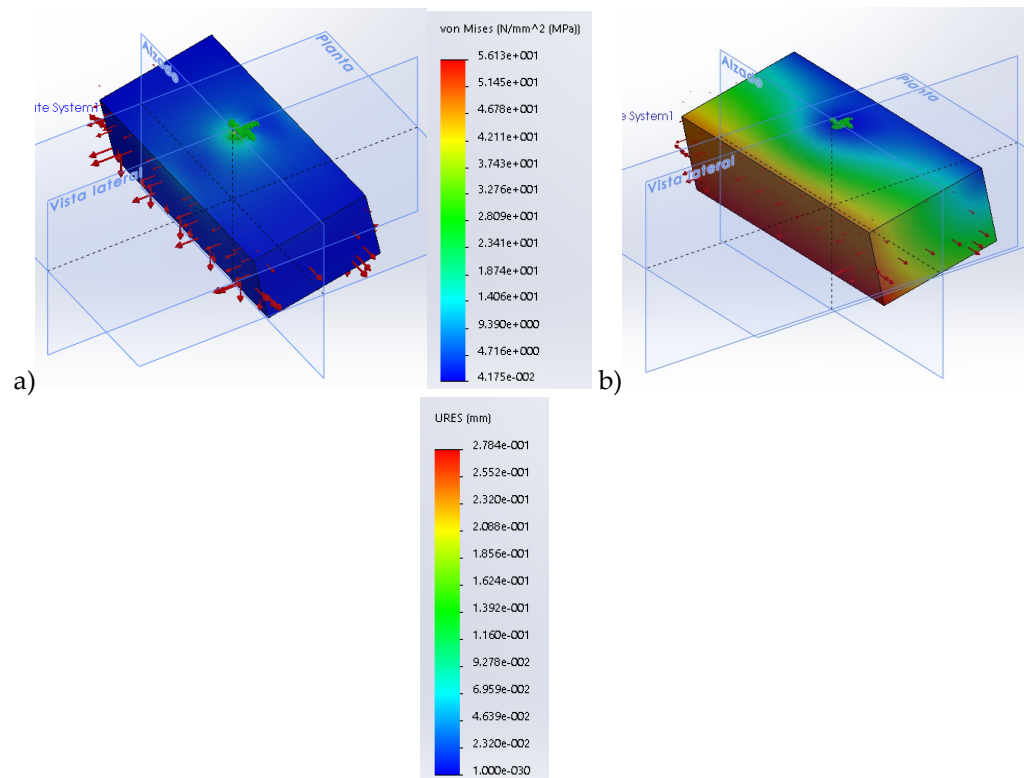


Figura 4. Depósito de drenaje. Tensiones equivalentes de Von Mises (MPa) y desplazamientos verticales (mm).

Errores fundamentales en la evaluación contemporánea de la solución del suelo a partir de lecturas de conductividad

Fundamental errors in contemporary soil solution evaluation using conductance ratios

R.C. Yudin-Fitzherbert^{1*}, Y.C. Li², M.C. Martinez-Ballesta¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, Spain.

²Tropical Research and Education Centre, University of Florida, 18905 S. W. 280th Street, Homestead, Florida, USA.

*ryudin@ufl.edu

Abstract

This study shows the danger of using universal conversion ratios found in literature for converting test results taken in the rhizosphere into proportions of different materials that can be found in the root zone. The use of “standard” ratios can lead to under- and over-estimates of the real levels of target chemicals, with negative effects on crops. This type of conversion error can also impact food safety and affect the health of animals and humans.

Key words: salinity; soil moisture; fertilizer toxicity; pathogen control.

Resumen

Este estudio revela el error de usar patrones generales publicados para convertir los resultados de muestreos hechos en la fracción líquida de la rizosfera a proporciones de distintos materiales que pueden estar presentes en la zona radicular. El uso de dichos patrones puede llevar a sub- y sobreestimaciones de la verdadera presencia de los materiales evaluados, con efectos nocivos sobre los cultivos. Esta clase de errores también tienen impacto sobre la inocuidad de los alimentos, y la salud humana.

Palabras clave: salinidad; humedad del suelo; toxicidad de abonos; control de patógenos.

1. INTRODUCTION

1.1 Background

Root zone pathology problems can result from fertilizers, sanitizing products, and pesticides. The relative presence of all three types of chemicals in solutions is commonly evaluated using electro-conductivity (EC) readings. EC results are converted to other measures using fixed ratios given in publications. If the ratios are not accurate then the true level of a chemical in a solution is misrepresented. Crop damage and health hazards can result.

Many handheld electronic gauges for testing EC in liquids are sold. Users insert a probe with two fixed electrodes into their target solution, and the gauge shows a number on a screen, either directly in milliSiemens per centimeter (mS/cm,) or indirectly, using a conversion ratio (CR), as parts per million (ppm) of total dissolved solids (TDS). Similar gauges for irrigation work give EC-based osmotic pressure (OP) in atmospheres (Atm), using other pre-set ratios. This study only tests the reliability of TDS instruments. A separate paper will examine EC-based OP probes. The EC method has long been used to check TDS content of industrial water. Guides to using irrigation water's EC to indicate “salinity” appeared early (1). “Salinity” was defined as the effect of high TDS on plant water uptake, not the toxic effect of NaCl on soil and plant chemistry. All early papers warned of variable EC caused by differences in chemical content. TDS is often used to show the fitness of fertigation water. Several authors have offered “universal” EC to TDS ratios in ppm (2).

1.2 Objectives

1.2.1-Determination of electro-conductivity: As part of testing all published conversion ratios, OP and EC readings were made of dissolutions of a series of ionic chemicals often found in the rhizosphere. EC results of equal molalities of selected chemicals are tabulated for comparison.

1.2.2- Theoretical TDS in ppm were calculated from molecular weights of salts used to make each solution divided by its respective EC result. No allowance made for actual TDS being lower than theoretical. Not all chemicals are fully dissociated at room temperature (25°C). Expected solubility of salts at each concentration checked using “Minteq 3.1” software.

1.2.3.-Depending on the foregoing, new ratios, or procedures, will be recommended.

2. MATERIALS & METHODS

2.1 Selection of soil amendments

The phrase “soils amendments” covers both fertilizers and other ionic chemicals with no nutrient value found in soils, included for comparison with nutrient salts of similar formulae. All were ionic “Lewis” salts that dissociate in solution. Solvent was distilled deionized water (DDIW) with 0 EC. Fertilizers were ammonium chloride (NH_4Cl), ammonium nitrate (NH_4NO_3), monoammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), potassium chloride (KCl), potassium nitrate (KNO_3), monopotassium phosphate (KH_2PO_4), potassium sulphate (K_2SO_4), sodium nitrate (NaNO_3) and Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$). Three other salts named in soil salinity studies were: Calcium chloride (CaCl_2), calcium sulphate (CaSO_4), and magnesium sulphate (MgSO_4). Sodium sulphate (Na_2SO_4) added to allow contrast of all four anions for all three monovalent cations. NaCl’s effect on seed germination has been studied extensively (3). Monocalcium phosphate ($\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$) proved insoluble. All certified as “reagent grade” by the American Chemical Society (ACS), supplied either by Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) or Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, Inc, St. Louis, MO). Limiting electrical conductivity (LEC) for each ion was researched to calculate the combined LEC for each molecule..

2.2 Instrumentation

A Mettler PE 2000 scale, precise to 0.1 gram (g), was used to prepare 0.1 molal (M) solutions (Mettler Toledo LLC, Columbus, OH). Stock solution EC tested with a Fisher Model 5003 instrument (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) Accuracy of EC checked using certified “Orion” brand KCl solutions (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Seven TDS probes were obtained by purchase or on loan. One had a CR of 400 ppm per mS/cm; another used 500 ppm per mS/cm, four used a CR of 640 and one had a choice of either 640 or 700 CR’s. Only one of the 640 ppm per mS/cm probes could be reprogrammed for a different CR.

2.3 Solution preparation

All solutions were made in a glass graduated cylinder tared on the PE 2000 scale. One twentieth mole of each salt was added to the cylinder. Distilled deionized water (DDIW) was added until the net weight of the solvent was 500.0 g. Variances in salt density from that of water were not considered. EC readings of newly mixed solutions varied over time. Before recorded tests, the EC of NaCl solutions was measured every 15-20 minutes over a two-hour period, and stabilized after an hour with a loss of 0.01 mS/cm. The loss is within limits for EC readings (2).

2.4. EC readings

Readings were made in 0.1 M stock solutions except for calcium sulphate. Turbidity meant CaSO_4 readings could not start until dilution reached 0.0125 M. Eighty ml of each liquid was poured into a 125 milliliter “Winpak A325” food-grade polypropylene tub (Winpak Ltd., Winnipeg, Canada) and left to equilibrate for 15 minutes. The EC of the tub contents was read successively until three consecutive readings coincided. Both probe electrodes were fully

immersed (4). The EC of each solution was recorded. Tubs were emptied, triple rinsed with DDIW and dried over paper towels before each new salt solution was tested.

2.5. Statistical evaluation and data collection

Results of multiple readings of each type of measurement were recorded and tabulated, and means (Ψ), standard deviations (σ), coefficients of variation (CV), and standard errors calculated.

3. RESULTS & DISCUSSION

Theoretical TDS results per unit of EC for 0.1 M solutions of sixteen salts assuming complete dissociation are shown in Table 1 with lowest result at the top. The table starts with four chloride salts with least ppm per mS/cm and ends with three phosphates having the most ppm per mS/cm. Ψ is +/- 950 ppm, far above the two popular ratios, with σ of 407 ppm, giving a CV of 43%. The standard error was 102 ppm. The range of 1429 ppm is almost 4 σ , showing that using EC to TDS conversion ratios based on NaCl or KCl to estimate levels of other minerals is risky.

The LEC of each solute ion differs, affecting EC. Chlorides have highest conductivity per unit of weight and phosphates the lowest, dictating the ranking of salts including them. Addition of phosphate raises soil EC less than adding an equal molality of the chloride or a nitrate of the same cation. A solution with equally molal sulphate salt has a higher EC than that of same amount of the chloride or nitrate of the same cation. This was seen for ammonium (NH_4^{+1}), calcium (Ca^{+2}), Magnesium (Mg^{+2}), Potassium (K^{+1}) and Sodium (Na^{+1}). Apart from the cation group behavior, no other consistency was seen over the range of 16 results.

The 15 0.1 M salt solutions (CaSO_4 omitted) had EC from 6.4 mS/cm to 22.4 mS/cm, with $\Psi = 12.8$ mS/cm and $\sigma = 4.5$ mS/cm (Table 1). The EC range is 3.6 σ wide. Each mineral salt has a unique ratio of molality to EC. No universal ratio is valid. The ranking is not the same for TDS.

Published EC levels for minimal risk irrigation water are 0 to 2 mS/cm, and low-risk water from 2 to 4 mS/cm (5). These generalizations are unsafe. Fertilizer mixes can have a "safe" level of EC but with a high risk of slowing water uptake in the root zone. The wide range of the TDS:EC ratios shows that reliance on "universal" ratios can harm crops through high TDS slowing root zone water flow or excessive ion activity blocking nutrient uptake, e.g. Na^+ blocking K^+ uptake (6).

4. CONCLUSIONS

No EC to TDS ratio is universally applicable. If gauges are calibrated with a certified standard, probe result accuracy in mS/cm is reliable at low modalities. Results in ppm were inconsistent. Probes have pre-set mS/cm to ppm CR which differ between brands and models.

Total dissolved solids gauges do not give true ppm for an active substance unless calibrated in a pure solution of the target chemical, and other substances present in the rhizosphere are considered. These probes can only be used to check samples of pure tank mixtures of the same salt after calibration with a certified EC standard, a conductive salt solution of known concentration, and raw samples of the agricultural water used in the mix.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the staff and faculties of three University of Florida laboratories for giving use of instruments and supplies: the Soil and Water Science laboratory at the Tropical Research & Education Center in Homestead, the Ornamental Horticulture Laboratory in Fort Lauderdale, and the Electron Microscopy Core Facility in Gainesville. This study is part of the AGROALNEXT programme, supported by MICIU funded by European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Fundación Séneca with funding from Comunidad Autónoma Región de Murcia (CARM).

6. REFERENCES

1. Whitney M, Means TH. An Electrical Method of Determining the Soluble Salt Content of Soils: US Government Printing Office; 1897.
2. Rhoades JD. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods. 1996 Jan 1;5:417-35.
3. Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and environmental safety. 2005 Mar 1;60(3):324-49.
4. Hochmuth G, Hanlon E. Principles of Sound Fertilizer Recommendations: SL315/SS527, 2/2010. EDIS. 2010 Apr 30;2010(2).
5. Ayers RS, Westcott DW. Water Quality for Agriculture. FAO, Rome, 1985
6. Maas EV, Grattan SR. Crop yields as affected by salinity. Agricultural drainage. 1999 Jan 12;38:55-11

Table 1. Electro-conductivity(EC) and total dissolved solids (TDS) ratios of 0.1 molal (M) solutions of fifteen reagent-grade mineral salts. Calcium sulphate (CaSO₄) insoluble at 25^o Celsius at 0.0125 M for comparison Listed by parts per million (ppm) needed to pass a current of one milliSiemens per centimeter (mS/cm).

Salt name	Formula	TDS	Ranking	EC	EC ranking
Ammonium chloride	NH ₄ Cl	434	1	11.35	7
Potassium chloride	KCl	568	2	12.80	10
Sodium chloride	NaCl	550	3	10.55	6
Calcium dichloride	CaCl ₂	645	4	17.20	14
Ammonium nitrate	NH ₄ NO ₃	663	5	12.23	8
Ammonium sulphate	(NH ₄) ₂ SO ₄	670	6	19.80	15
Potassium nitrate	KNO ₃	768	7	13.18	11
Dipotassium sulphate	K ₂ SO ₄	777	8	22.40	16
Calcium sulphate (0.0125 M)	CaSO ₄	784	9	15.28	12 (extrapolated)
Sodium nitrate	NaNO ₃	855	10	9.89	4
Disodium sulphate	Na ₂ SO ₄	864	11	16.44	13
Magnesium sulphate	MgSO ₄	1212	12	9.90	5
Calcium dinitrate	Ca(NO ₃) ₂	1312	13	12.53	9
Ammonium phosphate	NH ₄ H ₂ PO ₄	1420	14	8.29	2
Monopotassium phosphate	KH ₂ PO ₄	1609	15	8.48	3
Sodium phosphate	NaH ₂ PO ₄	1863	16	6.40	1
TDS: Mean 950, Standard Deviation 428, Coefficient of Variation 45%, Standard. Error 107					
EC Mean: 12.52, Standard Deviation: 5. 23, Coefficient of Variation: 42% Standard Error: 1.30					

Desarrollos tecnológicos en sistemas de gestión precisa de cabezales de fertirrigación

Technological developments in precise management systems for fertigation heads

M. Soler^{1*}, B. Hernández¹, N. Carrasco¹, J. Fernández¹, D. Parras², J.M. Molina¹

¹Grupo de Investigación de Ingeniería Agromótica y del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Estructuras, Construcción y Expresión Gráfica, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*manuel.ia@agrosolmen.es

Resumen

Las técnicas de riego de precisión, empleando sistemas de riego localizado, permiten la optimización del uso del agua de riego. El fertirriego permite la nutrición de los cultivos a través del riego; para conseguir una nutrición precisa, se requiere de sistemas de fertirrigación que permitan una aplicación exacta de fertilizantes. El desarrollo de nuestro grupo de investigación se ha centrado en cuatro líneas de trabajo: controlar el programador de riego, habiendo logrado una herramienta web capaz de ayudar al usuario; estimar las necesidades nutricionales del cultivo, habiendo desarrollado una herramienta web que las ajusta en función de la fase fenológica; calcular las soluciones nutritivas, disponiendo una herramienta web que establece las soluciones a establecer en cada depósito; y establecer la consigna de trabajo del sistema de inyección, en función de su configuración, para lo que se cuenta con una calculadora de la consigna de fertirrigación.

Palabras clave: Fertilización proporcional; fertirrigación; nutrición vegetal; riego de precisión.

Abstract

Precision irrigation techniques, using localized irrigation systems, allow optimization of the use of irrigation water. Fertigation allows crops nutrition through irrigation; to achieve precise crops nutrition, fertigation systems are required that allow exact application of fertilizers. The development of our research group has focused on four work lines control the irrigation programmer, having achieved a web tool that help the user; estimate the crops nutritional needs, having developed a web tool that adjusts them based on the phenological stage; calculate nutrient solutions, providing a web tool that establishes the nutrient solutions in each tank; and establish the setpoint of the injection system, depending on its configuration, for which there is a fertigation setpoint calculator.

Keywords: Fertigation; plant nutrition; precision irrigation; proportional fertilization.

1. INTRODUCCIÓN

La escasez de agua es notoria en el Sureste español, y los sistemas de riego localizado permitirán, apoyados en sistemas de control eficiente de las necesidades hídricas de los cultivos, aplicar la cantidad exacta de agua en cada momento, ahorrando en el consumo de este escaso recurso. Igualmente, los fertilizantes tienen escasa disponibilidad (1), Pero la nutrición vegetal está directamente relacionada con el riego localizado, para lo que se necesitan realmente sistemas de fertirriego, que sean capaces de aportar el agua y los nutrientes en cada momento a los cultivos (2). Es importante para un correcto desarrollo de los cultivos, poder aplicar la fertilización

distribuida a lo largo del tiempo de riego (guardando los periodos de preriego y postriegos para las cargas y descargas de las conducciones); Además, es vital proteger el suelo de la lixiviación de los nutrientes (3,4). Existe tecnología en el mercado para conseguir una aplicación precisa de la fertilización a lo largo del tiempo de riego, generalmente mediante equipos de fertirrigación compuestos por venturís, pero son equipos costosos de implementar, y en algunas explotaciones no son viables económicamente.

Por otro lado, los sistemas de aplicación de fertilizantes están compuestos por mecanismos que entienden de tiempos de activación de determinados relés, o de lecturas de parámetros como pH, conductividad eléctrica o caudales. Pero es necesario un preciso conocimiento del sistema para poder traducir las necesidades nutricionales de una planta al sistema de trabajo de un equipo de fertirrigación, máxime cuando hay diluciones que se realizan en los tanques fertilizantes. El empleo de sistemas más sencillos de fertilización, junto con la implementación del conocimiento necesario en los sistemas de control, permitirá al usuario tener una experiencia más sencilla en cuanto a la programación de fertirriego. Además, permitirá la aplicación precisa de agua y fertilizantes a los cultivos, puesto que se aporta el conocimiento más técnico al control, minimizando el riesgo de cometer errores por el usuario. El objetivo de este trabajo es conseguir una herramienta de programación de la fertirrigación útil para el usuario; para ello se dispone de varias líneas de trabajo de investigación desarrollados en el seno del Grupo de Investigación de Ingeniería Agromótica y del Mar de la Universidad Politécnica de Cartagena, trabajando en la programación del riego, el cálculo nutricional, la preparación de soluciones nutritivas, y la dosificación de fertilizantes, para concluir en una herramienta web completa e integral.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha realizado un profundo análisis de la oferta en el mercado de sistemas de fertirrigación y sus componentes, así como su funcionamiento, consumo energético y potencialidad de uso. Gracias a ese análisis, se han establecido distintas sublíneas de trabajo dirigidas todas en la línea de dotar de conocimiento a los sistemas de control de los cabezales de fertirrigación para minimizar el riesgo de cometer errores por el usuario y maximizar la precisión del sistema.

2.1 Control de los programadores de riego

Esta línea está encaminada a disponer de un servidor en la nube donde se incorporen los conocimientos necesarios para el control sencillo del sistema de fertirrigación, pero a su vez una aplicación precisa del fertirriego. Se programa un *front-end* intuitivo, donde permita gestionar la parte de riego mediante tiempos de riego, que podrán automatizarse en función de otras líneas de desarrollo en cuanto a la monitorización del estado hídrico del suelo. La parte de la fertilización se está desarrollando buscando recibir unas necesidades nutricionales concretas, y la fabricación de las distintas soluciones nutritivas a inyectar. En el *back-end* se desarrollan los cálculos necesarios para que las demandas del usuario en la programación del fertirriego, se traduzcan en consignas concretas de los sistemas de actuación del cabezal de fertirriego.

- a) Se desarrolla un enlace con API's de distintos equipos comerciales. Consiste en el cálculo en el servidor de los valores para los distintos parámetros que tienen que escribirse en los distintos campos de un programador de riego.
- b) Se desarrolla un sistema de programación conectado con el servidor, a través de PLC's comerciales, encaminados a que la interfaz de programación está alojada en el servidor, y éste le enviará las órdenes concretas para que el PLC controle el fertirriego.
- c) Se desarrolla una placa electrónica propia, con capacidad para poder establecer el control del fertirriego, cuya interfaz de programación está alojada en el servidor.

2.2 Cálculo de las necesidades nutricionales de los cultivos

Se desarrolla una herramienta que unifica varias bases de datos: cultivos, con sus fases fenológicas y duraciones dentro el ciclo de cultivo; necesidades nutricionales de cada cultivo en

función de su fase fenológica; fertilizantes comerciales, con sus riquezas y solubilidades; análisis de la composición química del agua de riego, con aguas tipo preestablecidas, y posibilidad de introducir análisis específicos; y características de una explotación concreta en cuanto a superficies, tipos de cultivo y fecha de plantación. Esta herramienta está preparada para predecir las necesidades nutricionales de un cultivo determinado en función de su fase fenológica; a continuación, se tienen en cuenta los aportes nutricionales por el agua de riego; y en base a una lista de fertilizantes favoritos del usuario, se pueden establecer las cantidades de fertilizantes comerciales a aplicar para cubrir las necesidades nutricionales previstas.

2.3 Cálculo de las soluciones nutritivas

Una vez que se dispone de una recomendación de fertilizantes comerciales, se cruzan los datos de distintas bases de datos: características de la instalación de fertirrigación en cuanto a los tanques disponibles y su capacidad; solubilidades y compatibilidades de los fertilizantes. Con esta información, se ofrece una estrategia de preparación de soluciones nutritivas en los tanques del cabezal de riego, donde se establece la cantidad de fertilizantes a aplicar en cada tanque, y la cantidad de agua que hay que aplicar a cada tanque.

2.4 Programación del sistema de fertirrigación

Conociendo las necesidades nutricionales, así como las soluciones nutritivas establecidas, se emplean los datos de la explotación en cuanto a superficies de riego y pluviometría del sistema, además del tipo de inyectores de fertilizantes. Con todo, se calculan las consignas con las que hay que programar la fertirrigación, que permitirán abastecer la nutrición demandada por el cultivo a través del sistema de fertirrigación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la parte de la programación de riego, se ha conseguido un entorno de programación único, independiente del equipo que se esté programando, que aporta las siguientes ventajas en cuanto a la experiencia del usuario: permite seleccionar agrupaciones de sectores previamente establecidas, calculando sus superficies y cantidad de plantas, así como caudal requerido. Se reduce la posibilidad de cometer errores al seleccionar los sectores que se riegan simultáneamente; permite establecer la hora de inicio al primer programa, y concatenar los siguientes, sin necesidad de calcular la hora de inicio de todos ellos. Reducirá el error y evitará que se produzcan solapes entre programas de riego; y permite conocer el tiempo disponible para el abonado, en base a la duración de riego, así como los tiempos de preriego y postriego.

Para el cálculo de las necesidades nutricionales, se ha conseguido una aplicación web que permite establecer las necesidades nutritivas de un cultivo determinado en función de su fase fenológica, ofreciendo una tabla de requerimientos de los componentes básicos, editable a criterios del usuario. A partir de la solución finalmente requerida, se pueden seleccionar los fertilizantes elegidos por el usuario a su criterio, para conocer la cantidad exacta de nutrientes que hay que aplicar en cada riego. Con esta información previa, y considerando los depósitos de fertilizante que configuran al cabezal de riego, se establece una configuración automática de distribución de las distintas soluciones nutritivas a preparar. Ésta se podrá editar, y será el usuario el que establezca la distribución de los fertilizantes en los tanques disponibles, pero siempre teniendo en cuenta la compatibilidad.

Con todo, finalmente se establecen las diluciones de los distintos fertilizantes para suplir las necesidades nutricionales del cultivo, y que va a ofrecer la información necesaria para calcular las consignas de inyección del sistema de fertirrigación. Se presenta que hay distintos tipos de configuración en la programación de las consignas de los inyectores: por tiempo: se trata de programar el tiempo de activación de un inyector concreto. Para emplear esta configuración, es necesario conocer el caudal de inyección del inyector, que es un dato de entrada en la configuración de la instalación; por volumen: se trata de programar la cantidad de abono a aplicar

a través de un inyector concreto. Dependiendo del caudal de inyección del inyector, se tardará más o menos tiempo en alcanzar el volumen. Como se conoce el tiempo que hay disponible para la fertirrigación, se podrá comprobar si se puede aplicar la dosis prevista; y por volumen proporcional: esta configuración requiere de un sistema capaz de ajustar continuamente el caudal de inyección del inyector, en función de una proporción parametrizada del caudal de agua circulante. Se requiere, por tanto, de contadores de agua y fertilizante, y de un control que permita establecer la proporcionalidad. En base a lo expuesto, se culmina la experiencia de programación de la fertirrigación, estableciendo consignas de tiempo, de volumen o de volumen proporcional (figura 1), a elegir en función de la configuración de la instalación, para conseguir aplicar los nutrientes previstos.

4. CONCLUSIONES

Con los desarrollos establecidos en esta línea, se conseguirá una programación intuitiva de la fertirrigación, donde el usuario tendrá que establecer la duración de riego y calcular la recomendación de la fertilización y la solución nutritiva a preparar; a partir de ahí, el sistema de riego quedará configurado para que aplique las necesidades estimadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a AGROSOLMEN, S.L., a GENHIDRO, y al Programa AGROALNEXT que ha sido financiado por MICIN con fondos NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la Fundación Séneca - Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia.

6. REFERENCIAS

1. Pagán FJ, Ferrández-Villena M, Fernández-Pacheco DG, Rosillo JJ, Molina-Martínez JM. Optifer: An application to optimize fertiliser costs in fertigation. Agric Water Manag [Internet]. 2015;151:19–29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377414003680>
2. Soler M, Parras D, Intrigliolo D, Molina JM. Development of a fertilization dosing tool for irrigation heads. In: 14th Frutic international symposium. Valencia; 2022.
3. Hirschi M, Michel D, Lehner I, Seneviratne SI. A site-level comparison of lysimeter and eddy covariance flux measurements of evapotranspiration. Hydrol Earth Syst Sci [Internet]. 2017;21(3):1809–25. Available from: <https://hess.copernicus.org/articles/21/1809/2017/>
4. Howell T, Schneider AD, Jensen M. History of Lysimeter Design and Use for Evapotranspiration Measurements. Lysimeters for Evapotranspiration and Environmental Measurements. 1991 Jan 1;1–9.

RESULTADOS	
Cantidad de solución nutritiva (L/riego)	
185	
Tiempo de inyección a inyección máxima (min/riego)	
37	
Consigna de abono proporcional (mL/m ³ = ppm)	
476	

Figura 1. Resultados de consignas para distintas configuraciones del sistema de fertirrigación.

Bloque III: Biotecnología

Control genético del quimiotipo en *Cannabis sativa*: más allá de las sintetasas de cannabinoides

Cannabis sativa chemotype control genes: beyond the cannabinoid synthases

A. Gila-Navarro*, M. Egea-Cortines, J. Weiss

Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*alberto.gila@upct.es

Resumen

Se ha construido un transcriptoma común de los tricomas de *Cannabis sativa* usando 24 variedades que pertenecen a los quimiotipos THC-dominante, CBD-dominante y Balanceado. Tras un análisis de expresión diferencial, solo hemos encontrado un gen de la ruta de síntesis de cannabinoides, CBDAS, fuertemente sobreexpresado en las variedades CBD-dominantes. Algunas proteínas relacionadas con las vacuolas y el transporte vesicular han aparecido sobreexpresadas en las variedades THC-dominantes. Estos resultados sugieren que la síntesis de CBD se regula transcripcionalmente mediante la expresión de CBDAS y que la de THC se regula post-transcripcionalmente mediante la localización de THCAS. El efecto de otros genes encontrados como factores de transcripción y enzimas de otras rutas metabólicas no está aún esclarecido.

Palabras clave: Transcriptoma común; expresión génica diferencial; transporte vacuolar.

Abstract

A core transcriptome of *Cannabis sativa* trichomes was built using 24 varieties belonging to THC-rich, CBD-rich and Balanced chemotypes. After a gene differential gene expression analysis, we found only one gene from the cannabinoid biosynthesis pathway, CBDAS, to be strongly upregulated in CBD-rich varieties. Some vacuolar and vesicle transport related proteins were upregulated in THC-rich plants. These results point towards a transcriptional regulation of CBD synthesis via CBDAS gene expression and a post-transcriptional one of THC synthesis via THCAS protein localization. The relevance of other genes we found like transcription factors and enzymes from other metabolic pathways is still unclear.

Keywords: Core transcriptome; differential gene expression; vacuolar transport.

1. INTRODUCTION

Cannabinoids are a large family of secondary metabolites originating from *Cannabis sativa*. They possess interesting therapeutical properties that have been exploited by humans for thousands of years. Biochemically, cannabinoids emerge as a confluence of the terpene and polyketid synthesis pathways. A phenolic intermediate is condensed with a terpene precursor to produce CBGA. This first cannabinoid is then converted enzymatically to THCA, CBDA or CBCA by three different enzymes that compete for it (1,2).

The relative quantities of the different cannabinoids is defined as the chemotype of a given strain. This is the trait of most importance regarding medicinal cannabis. The main chemotypes are THC-rich, CBD-rich, CBG-rich, THC-CBD Balanced, and Null (3). Research has focused on the genetic contribution to the chemotype of the terminal synthases THCAS and CBDAS. An autosomal

additive and codominant model with two loci has been proposed (4). However, there is still much variability between cultivars of the same chemotype and even between individuals of the same strain. This could be due to a combination of environmental factors and still poorly understood genes. We try in this study to identify other genes relevant to the chemotype control.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Data used

We downloaded 125 RNAseq samples from trichomes of *Cannabis sativa* from NCBI. Additionally, we took 15 samples from LinneoHealth.SL that belonged to three varieties, and we produced the RNAseq data ourselves. As metadata, we curated the information available on the internet for all these varieties and classified them as THC-rich, CBD-rich and Balanced.

2.2 Gene expression analysis

A core transcriptome was created as an unbiased reference to quantify the expression with Salmon. Transcript counts were summarized to gene counts with Tximport. Counts were filtered and normalized with edgeR (9). Genes were tested for differential expression with negative binomial quasi-likelihood ratio tests using edgeR. P-values were adjusted using the false discovery rate method.

3. RESULTS AND DISCUSSION

After the bioinformatic pipeline, the number of differentially expressed genes with statistical significance (adjusted p-value lower than 0.05) was 6918 between THC-rich and CBD-rich. The result is presented in Fig.1. To the best of our knowledge, this is the first transcriptomic study involving a core transcriptome in *Cannabis sativa*. Compared to the reference genome of transcriptome originating from a single variety, our core transcriptome is more representative and unbiased against cannabinoid synthases gene number variation (5).

In Fig. 1 we have highlighted the genes with the most extreme fold change and significance. But only one of them, CBDAS belongs to the cannabinoid biosynthesis pathway. A similar result was found by van Bakel et.al (6) in the first-ever sequenced transcriptome of two strains of *Cannabis sativa*. Other genes with special relevance are the vacuolar transport-related VPE, VAP4-1 and VPS32. Both CBDAS and THCAS must reach the secretory cavity of the trichomes to catalyze their reactions within vesicles (7). They could play a role in THC synthesis since they are up-regulated in THC-rich varieties.

However, little is known about the effect of the other genes. Our analysis may be hampered by the heterogeneous nature of the CBD-rich plants included in the study compared to the THC-rich ones (data not shown). In fact, we only had three varieties identified as CBD-rich of which two are drug-producing cultivars and one (Finola) is an oil-producing hemp strain (6,8)

4. CONCLUSIONS

Among all the genes of the cannabinoid biosynthesis pathway, only CBDAS is clearly capable of distinguishing CBD-rich from THC-rich varieties. CBD synthesis seems to be controlled at the transcription level of CBDAS while THC-synthesis could be controlled at the protein localization of THCAS.

5. ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude towards Linneo Health S.L for the information and material provided for this analysis. A.Gila-Navarro receives funding from an FPU fellowship FPU21/02130 from the Spanish Ministry of Universities. This work was funded by Project PID2021-127933OB-C21 financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and FEDER to M.Egea-Cortines and J.Weiss.

6. REFERENCIAS

1. Hurgobin B, Tamiru-Oli M, Welling MT, Doblin MS, Bacic A, Whelan J, et al. Recent advances in Cannabis sativa genomics research. *New Phytol.* 2021;230(1):73–89.
2. Walsh KB, McKinney AE, Holmes AE. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Front Pharmacol.* 2021 Nov 29;12:777804.
3. de Meijer EPM, van der Kamp HJ, van Eeuwijk FA. Characterisation of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica.* 1992 Jan 1;62(3):187–200.
4. Wenger JP, Dabney III CJ, ElSohly MA, Chandra S, Radwan MM, Majumdar CG, et al. Validating a predictive model of cannabinoid inheritance with feral, clinical, and industrial Cannabis sativa. *Am J Bot.* 2020;107(10):1423–32.
5. Vergara D, Huscher EL, Keepers KG, Givens RM, Cizek CG, Torres A, et al. Gene copy number is associated with phytochemistry in Cannabis sativa. *AoB PLANTS.* 2019 Nov 1;11(6):plz074.
6. van Bakel H, Stout JM, Cote AG, Tallon CM, Sharpe AG, Hughes TR, et al. The draft genome and transcriptome of Cannabis sativa. *Genome Biol.* 2011;12(10):R102.
7. Rodziewicz P, Loroach S, Marczak Ł, Sickmann A, Kayser O. Cannabinoid synthases and osmoprotective metabolites accumulate in the exudates of Cannabis sativa L. glandular trichomes. *Plant Sci.* 2019 Jul 1;284:108–16.
8. Laverty KU, Stout JM, Sullivan MJ, Shah H, Gill N, Holbrook L, et al. A physical and genetic map of Cannabis sativa identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome Res.* 2019 Jan 1;29(1):146–56.

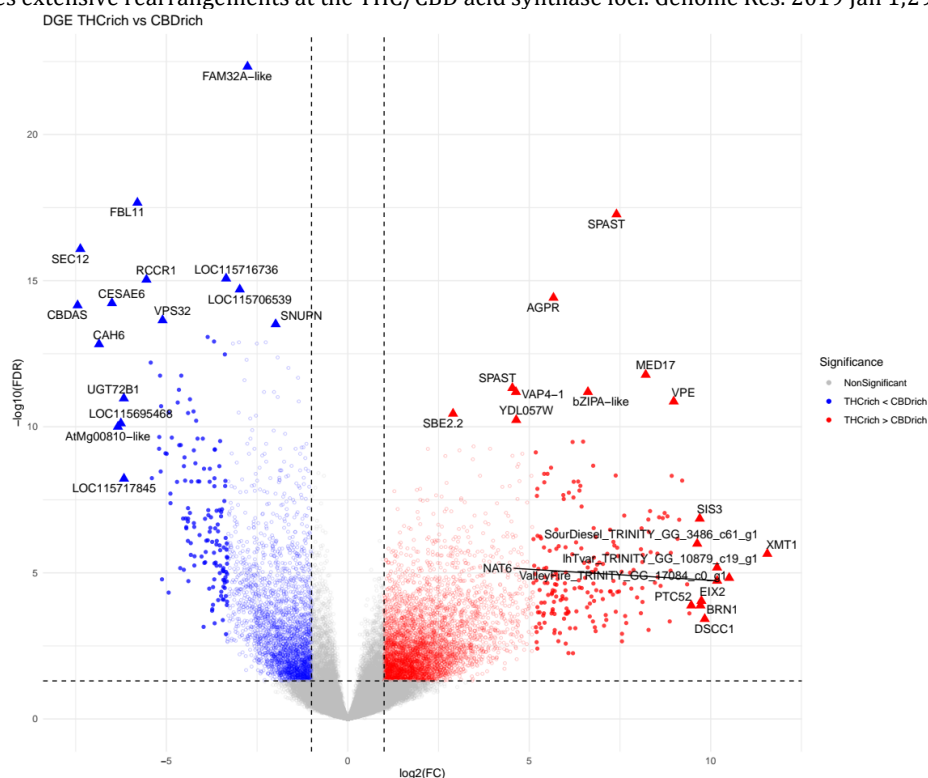


Figure 1. Differential gene expression results. Each dot is a gene. Color represents fold change sign. Dashed lines represent thresholds. Axes represent fold change and adjusted p -value

Caracteres de crecimiento y de calidad de la canal en pollos de raza Gallina Murciana, Hubbard JA757 y su cruzamiento

Growth and carcass quality traits in Gallina Murciana, Hubbard JA757 and their crossbreeding chickens

L. Martínez-Martínez^{1*}, S. Rey-Antón¹, A. Vallecillos-Quijada¹, J. Orengo-Femenía², E. Armero-Ibáñez¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo 30100, Murcia, España.

*laura.martinez@edu.upct.es

Resumen

La raza autóctona Gallina Murciana (GM) posee una notable rusticidad y resistencia a condiciones adversas, si bien se encuentra en peligro de extinción debido a su escasa productividad. Este estudio evalúa un cruzamiento (GM50) entre la Gallina Murciana (GM100) y la estirpe Hubbard JA757 (GM0), con el fin de desarrollar un producto alternativo que mejore las cualidades cárnicas de la GM100 y preserve su supervivencia. Durante el ensayo, la línea GM50 mostró un crecimiento intermedio en comparación con las líneas parentales, acercándose más a las características de la GM100. Además, tanto la GM50 como la GM100 demostraron una distribución de la canal similar, con un notable aumento en el rendimiento de la pechuga (3,2%), mientras que el porcentaje de cuartos traseros fue similar. En general, los resultados respaldan la viabilidad comercial de la línea GM50, la cual contribuye a mejorar la productividad de la raza Murciana sin comprometer sus virtudes tradicionales.

Palabras clave: raza autóctona; cualidades cárnicas; productividad.

Abstract

The Spanish Gallina Murciana (GM), a local breed, exhibits remarkable rusticity and resilience to adverse conditions, albeit facing the threat of extinction due to its low productivity. This study assesses a crossbreeding (GM50) between the Gallina Murciana (GM100) and the Hubbard JA757 strain (GM0), aiming to develop an alternative product that enhances the meat qualities of GM100 while preserving its survival traits. Throughout the trial, the GM50 line showed intermediate growth compared to the parental lines, tending towards the characteristics of GM100. Furthermore, both GM50 and GM100 demonstrated a similar carcass distribution, with a notable increase in breast yield (3.2%), while the percentage of hindquarters remained comparable. Overall, the results demonstrated the commercial viability of the GM50 line, which contributes to enhancing the productivity of the Murciana breed without compromising its traditional virtues.

Keywords: local breed; meat traits; productivity.

1. INTRODUCCIÓN

La Gallina Murciana es una raza autóctona de la Región de Murcia, recogida en el apartado de especies en protección del Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (1). En marzo de 2023, empezaron a comercializarse productos de GM con el sello de Raza 100% Autóctona

“Murciana”, etiqueta de calidad concedido por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación como una iniciativa nacional para promover los productos locales.

Los pollos de raza Murciana son muy resistentes a las enfermedades y están bien adaptados a la climatología adversa y a las condiciones de cría con pocos recursos. Así, éstos suelen criarse en sistemas ecológicos o extensivos, garantizando altos estándares de bienestar animal. Esta raza es de crecimiento lento y presenta bajos rendimientos productivos (2), pero sus productos se perciben como más sanos y sabrosos. Sin embargo, a pesar de todas estas características, esta raza autóctona se encuentra en peligro de extinción motivado por su bajo interés productivo en comparación con las razas industriales, por lo que la búsqueda de una alternativa productiva para esta raza es vital para asegurar su desarrollo y subsistencia.

Por ello, en este trabajo se propone un cruzamiento con una línea industrial de aptitud cárnica, para combinar con la calidad de las características de la Gallina Murciana, obteniendo un producto alternativo más competitivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Estación Experimental Agroalimentaria Tomás Ferro (ESEA; La Palma, Cartagena), perteneciente a la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), contando con el informe favorable del Comité de Ética de Investigación de la Universidad.

2.1 Material animal

En el ensayo se criaron pollos macho de tres tipos genéticos: Gallina Murciana 100% (GM100, n = 27); estirpe industrial Hubbard JA757 100% (GM0, n = 45); y el resultado del cruzamiento de ambas, 50% GM x 50% JA757 (GM50, n = 38), cruzando gallos Murcianos con hembras Hubbard JA757. Los reproductores GM100 pertenecían a la granja de Gallina Murciana de la ESEA, y las hembras reproductoras Hubbard JA757 fueron proporcionadas por la empresa Hijos de Juan Pujante. Los pollos GM50 y GM100 se produjeron en la ESEA, constituyendo cuatro grupos de reproductores para cada línea (formado por un gallo y seis gallinas), y los pollos GM0 se recibieron con 1 día de edad por parte de la empresa Hijos de Juan Pujante. Se llevaron a cabo dos fechas de nacimiento de pollitos, que se constituyeron como lotes de engorde (Lote 1: 19/06/2023; Lote 2: 05/11/2023), y los animales se separaron por tipo genético, formando los grupos de engorde. El engorde de los individuos se realizó en condiciones semi-extensivas, con alimentación *ad libitum* y luz y ventilación natural. Cuando los individuos alcanzaron un peso final de aproximadamente 2,6 kg, se sacrificaron en el matadero de Hijos de Juan Pujante, tras el aturdimiento previo por CO₂.

2.2 Caracteres de crecimiento

Para estudiar los caracteres de crecimiento se controló semanalmente el peso de los animales, y se registró el peso vivo al sacrificio (PVS). También se cuantificó la cantidad de pienso aportado, midiendo el consumo de pienso por grupo de engorde, no el consumo individual. Finalmente, se calculó la Ganancia Media Diaria al día 49 (GMD₀₋₄₉): incremento de peso de cada grupo dividiéndolo por los 49 días de transcurso de lote; y el Índice de Conversión (IC): consumo de pienso total por grupo y lote, dividido por el incremento de peso total por grupo y lote.

2.3 Calidad de la canal

Tras el sacrificio de los individuos, se retiró el tracto gastrointestinal completo y se almacenaron a 4 °C durante 24 h. Se pesó la canal en frío (PCF) y se procedió con su despiece, pesando cada uno de los cortes de forma individual, expresando los principales cortes en porcentajes sobre el PCF. También se calculó el rendimiento de la canal (RC) como el PCF dividido entre el PVS.

2.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante R (versión 4.3.3 para Windows) tras comprobar su normalidad con el test Shapiro-Wilk. Para su análisis se utilizó un modelo lineal general que incluía como efectos fijos el tipo genético (GM100, GM50, GM0) y el lote de engorde (Lote 1, Lote 2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo de las tres líneas genéticas mostró numerosas diferencias significativas. La línea GM50 siguió un crecimiento intermedio con respecto a las líneas reproductoras (Fig. 1), con mayor similitud a la evolución paterna GM100, mostrando un peso al día 49 de edad de 1384 g, frente a los 839 g de los GM100 y los 3198 g de los GM0; una diferencia de 545 g y de 1814 g con las líneas GM100 y GM0, respectivamente (Tabla 1). Este resultado está directamente relacionado con la velocidad de crecimiento, además de con la capacidad de conversión de pienso en carne, presentando los GM50 un IC de 2,93 g/g, frente a 4,15 g/g de GM100 y 1,76 g/g de GM0. Estos resultados situaron al cruzamiento GM50 con índices de crecimientos más próximos a líneas de crecimiento lento, alcanzando los 2 Kg a los 70 días (Fig. 1), valores mostrados por otros autores en estudios similares (3).

Las líneas GM50 y GM100 mostraron una distribución de la canal análoga (Tabla 1); con un RC de 73,3% y 73,9%, respectivamente, y significativamente menor con respecto a GM0 (78,3%). GM50 obtuvo un porcentaje de cuartos traseros cercano a GM100 (30,1% y 31,0%, respectivamente) y mejoró el porcentaje de pechuga en un 3,2% respecto a GM100. En general, GM50 se asemejó a los valores obtenidos por GM100 y a los descritos por otros autores para otras razas autóctonas, como la raza Castellana Negra: porcentaje de pechugas del 17% (4) y 14% (5), y porcentaje de cuarto trasero del 30% (4) y 32% (5).

4. CONCLUSIONES

El cruzamiento entre la Gallina Murciana y la línea industrial Hubbard JA757, se identifica como una opción comercialmente viable, ya que mejora los índices productivos de la Gallina Murciana, disminuyendo significativamente los periodos de engorde. No obstante, es necesario ampliar el estudio con el análisis de la calidad de la carne, la actividad digestiva y factores de comportamiento, para comprobar que esta línea sigue manteniendo las virtudes de la raza autóctona.

5. AGRADECIMIENTOS

A la beca predoctoral 21849/FPI/22. Fundación Séneca. Cofinanciada por la empresa Avícola Levantina S.A. Región de Murcia (Spain).

6. REFERENCIAS

1. Ministerio de Agricultura P y A. BOE-A-2007-21498. Boletín Oficial del Estado [Internet]. 2007 [cited 2024 Apr 11];(299, 14 de diciembre):51370–51370. Available from: <https://www.boe.es/eli/es/o/2007/12/05/apa3628>
2. Martínez L. Efecto de la inclusión de la harina de algarroba en la dieta de pollos de engorde de raza Murciana sobre caracteres de crecimiento y de calidad de la carne [Internet] [Trabajo Fin de Máster]. [Cartagena]: Universidad Politécnica de Cartagena; 2021 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://repositorio.upct.es/handle/10317/10116>
3. Chodová D, Tůmová E, Ketta M, Skřivanová V. Breast meat quality in males and females of fast-, medium- and slow-growing chickens fed diets of 2 protein levels. *Poult Sci*. 2021 Apr 1;100(4).
4. Miguel JA, Ciria J, Asenjo B, Calvo JL, Gómara A, Francesch A. Comparación del crecimiento y la canal de diferentes tipos genéticos de pollos criados en régimen semiextensivo en la provincia de Soria. *ITEA*. 2008;104(3):381–98.
5. Miguel JA, Escoda L, Cubilo MD, Tor M, Asenjo B, Ciria J, et al. Efecto de la edad de sacrificio sobre las características del crecimiento y la canal en pollos de raza Castellana Negra mejorada y del cruce con la raza Penedesenca Negra mejorada. *ITEA*. 2011;107(3):226–38.

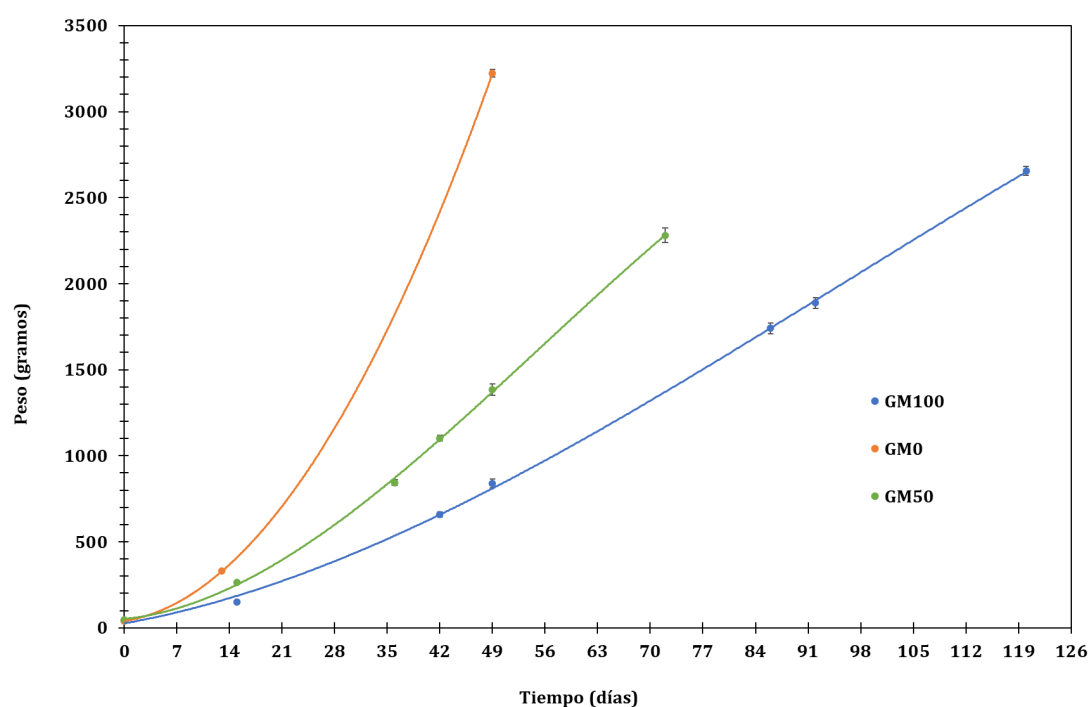


Figura 1. Evolución del crecimiento de las tres líneas genéticas: Gallina Murciana (GM100); Hubbard JA757 (GM0); Cruzamiento de GM100 y GM0 (GM50).

Tabla 1. Mediciones de caracteres de crecimiento y de calidad de la canal (media marginal $\pm$ error estándar).

	GM100	GM50	GM0
Edad sacrificio (días)	127 ^a	83 ^b	49 ^c
PVS (g)	2731 $\pm$ 49 ^a	2595 $\pm$ 46 ^b	3156 $\pm$ 38 ^c
Peso 49d (g)	839 $\pm$ 25 ^a	1384 $\pm$ 32 ^b	3198 $\pm$ 22 ^c
GMD ₀₋₄₉ (g/día)	18,4 $\pm$ 0,61 ^a	29,9 $\pm$ 0,71 ^b	65,0 $\pm$ 0,48 ^c
RC (%)	73,3 $\pm$ 0,28 ^a	73,9 $\pm$ 0,26 ^a	78,3 $\pm$ 0,23 ^b
Cuartos traseros (%)	31,0 $\pm$ 0,25 ^a	30,1 $\pm$ 0,23 ^b	27,1 $\pm$ 0,19 ^c
Pechugas (%)	14,3 $\pm$ 0,31 ^a	17,5 $\pm$ 0,28 ^b	27,8 $\pm$ 0,23 ^c
Alas (%)	10,7 $\pm$ 0,11 ^a	10,4 $\pm$ 0,11 ^a	8,81 $\pm$ 0,09 ^b
Carcasa (%)	25,0 $\pm$ 0,35 ^a	24,3 $\pm$ 0,33 ^a	22,6 $\pm$ 0,27 ^b

Diferentes superíndices dentro de cada fila, indican diferencias significativas entre tipo genético ($P < 0,05$); Gallina Murciana (GM100); Hubbard JA757 (GM0); Cruzamiento de GM100 y GM0 (GM50); PVS: Peso Vivo al Sacrificio; GMD₀₋₄₉: Ganancia Media Diaria al día 49; IC: Índice de Conversión; RC: rendimiento de la canal.

Bloque IV: Economía Agroalimentaria

¿Cómo incentivar la protección de sistemas agroforestales? Hallazgos de las preferencias de caficultores por adoptar buenas prácticas agrícolas

How to incentivize the protection of agroforestry systems? Findings on coffee farmers' preferences for adopting good agricultural practices

M. Valenzuela^{1*}, J.A. Zabala² F. Alcón¹

¹Departamento de Economía Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Economía Aplicada. Universidad de Murcia. Avda. Teniente Flomesta, 5, 30003, Murcia, España.

*mistral.valenzuela@edu.upct.es

Resumen

El café se cultiva en un sistema agroforestal, caracterizado por proporcionar importantes servicios ecosistémicos a la sociedad como la reducción de erosión, el soporte de la biodiversidad y la regulación de la temperatura, mitigando así los efectos del cambio climático. Sin embargo, las prácticas agrícolas actuales, basadas en el uso intensivo de inputs, están amenazando este sistema agroforestal y los servicios ecosistémicos que proporciona. Se vuelve necesario así promover Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) que proporcionen una alternativa sostenible al cultivo del café y que cuenten con el apoyo de los agricultores para su adopción. En este contexto, este estudio aplica un experimento de elección discreta a un grupo de caficultores con sistemas agroforestales de café con el fin de analizar su disposición a aceptar (DAA) de un conjunto de BPA. Para ello, se han entrevistado a 238 caficultores en la República Dominicana, cuyos resultados muestran una fuerte DAA de estas nuevas prácticas por parte de los caficultores, ya que el 89% de estos están dispuestos a cambiar su situación actual por un incentivo de US\$612.23 US\$/ha/año para adoptar todas las BPA consideradas.

Palabras clave: Experimentos de elección discreta, República Dominicana, disposición a aceptar, adaptación al cambio climático.

Abstract

Coffee is grown in an agroforestry system that provides important ecosystem services such as reducing erosion, supporting biodiversity, and regulating temperature, thereby mitigating the effects of climate change. However, current agricultural practices based on intensive use of inputs are threatening this agroforestry system and the ecosystem services it provides. Thus, it is necessary to promote Good Agricultural Practices (GAP) that provide a sustainable alternative to coffee cultivation and have the support of farmers for their adoption. In this context, a study applied a discrete choice experiment to a group of coffee farmers with coffee agroforestry systems to analyze their willingness to accept (WTA) a set of GAP. The study interviewed 238 coffee growers in the Dominican Republic, and the results showed a strong willingness to accept these new practices on the part of coffee growers. 89% of growers were willing to change their current situation for an incentive of US\$612.23 US\$/ha/year to adopt all the GAP considered.

Keywords: Discrete choice experiments, Dominican Republic, willingness to accept, adaptation to climate change.

1. INTRODUCCIÓN

El impacto macroeconómico y social del cambio climático en la producción de café en Latinoamérica representa más 200 millones de dólares en pérdidas solo entre los años 2010-2014 donde más de 2,000 núcleos familiares han abandonado la producción cafetalera debido a la pérdida de bosques, biodiversidad y el impacto en las zonas hábiles para la producción.(1) Estos impactos ambientales van en aumento, donde las altas temperaturas provocan la prevalencia de plagas y enfermedades, un ejemplo de esto es el impacto de la Roya del Café (*Hemileia vastatrix* HV), un hongo que ataca las hojas de los cafetos y disminuye la productividad en más de 50%.(2)

En la Republica Dominicana el café se produce como un Sistema Agroforestal (SAF), que se define como “la forma de usar la tierra, que implica la combinación de especies forestales, en tiempo y espacio, con especies agronómicas, en procura de la sostenibilidad del sistema”. Al establecer un SAF se deben aplicar técnicas de manejo de uso del suelo, combinando árboles de uso múltiple y maderables con cultivos agrícolas perennes(3)

Actualmente existe una tendencia productiva, tanto en Centroamérica como el Caribe, de cafetales como monocultivo y altamente demandantes de insumos para suplir la demanda mundial de café. Sin embargo, se ha demostrado que este sistema aumenta el uso de fertilizantes minerales, creando impactos climáticos negativos, como el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (4,5).

Ante esto, se proponen buenas prácticas agrícolas (BPA), definidas como “un conjunto de acciones o prácticas que se realizan en una explotación agrícola, tendientes a reducir los peligros químicos, físicos y microbiológicos con métodos ecológicamente seguros, higiénicamente aceptables y económicamente factibles”(6).

La investigación busca demostrar que “cuando se integran los beneficios económicos y ambientales el productor tiene la disposición para adoptar buenas prácticas agrícolas para aumentar su capacidad de adaptación al cambio climático, siempre y cuando se provean incentivos, acompañamientos y extensión agrícola”. Por ello, el objetivo de este trabajo es analizar la disposición de los caficultores a adoptar BPA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de caso se desarrolló en la Cuenca del Rio Yaque del Sur (CRYS) en la parte alta e intermedia de la cuenca, ubicada en la región Suroeste de República Dominicana con una superficie de 5,067.07 km² donde su parte más alta es de 2,500 msnm, abarca las provincias de San Juan, Azua, La Vega y Bahoruco.(8). Un SAF de café promedio en la República Dominicana se caracteriza por combinar especies como son la Guama *Inga edulis*, Aguacate *Persea americana*, Naranja *Citrus × sinensis*, Banano *Musa × paradisiaca*, Yautía *Colocasia esculenta* y Yuca *Manihot esculenta*. (3).

2.1 Diseño de Experimento de Elección Discreta

La disposición a adoptar las BPA por parte de los caficultores dominicanos se va a analizar mediante un Experimento de Elección Discreta (EED). Un EED es un método de preferencias declaradas y se basa en datos procedentes de encuestas donde se determina la disposición a pagar o percibir ingreso a cambio de una modificación de su comportamiento actual para aumentar algún activo natural o beneficiar a grupos. De este modo, cada caficultor elegirá aquellas BPA que, dado el incentivo mostrado, maximicen su nivel de utilidad. (9)

Para la selección de las BPA en un SAF se utilizó el manual de monitoreo y evaluación de BPA, las cuales representan los atributos del experimento. Al final del experimento se han seleccionado las BPA: construcción de reservorio de agua, fertilización mineral eficiente, fertilización orgánica, control biológico, fumigación con bioles, rotación con leguminosas, diversificación con maderables, luego de esto se procedió hacer la caracterización económica de las BPA dando como resultado un incentivo de entre 200-1600 dólares/ha/año. Finalmente, los atributos y niveles fueron combinados siguiendo un diseño S-eficiente ver figura 1. (11).

2.2 Modelo econométrico

Los experimentos de elección discreta están basados en la teoría del bienestar de Lancaster, por la cual la utilidad proporcionada por un bien o servicio se obtiene como la suma de la utilidad proporcionada por cada una de las partes que lo componen. (12). El valor, o disposición a aceptar, de cada BPA depende del incentivo hipotético planteado, a partir de la relación marginal de sustitución entre este y cada una de las BPA para la que se calcula.

Los resultados del EED se han analizado siguiendo un modelo logarítmico condicional (LC) siguiendo la siguiente expresión:

$$U_{ijt} = \beta_0 * SQ + \beta_1 * WRE_{jt} + \beta_2 * FE.EF_{jt} + \beta_3 * FE.ORG_{jt} + \beta_4 * BControl_{jt} + \beta_5 * BiolF_{jt} + \beta_6 * ROTA_{jt} + \beta_7 * DIVER_{jt} + \beta_8 * INCTV_{jt} + \varepsilon_{ijt}$$

El coeficiente β_0 representa la utilidad percibida por el agricultor para continuar con las prácticas de cultivo actuales. Por su parte, los coeficientes $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6, \beta_7$ representan la utilidad marginal asociada a cada BPA, mientras que β_8 se asocia con la probabilidad de que el productor seleccione el conjunto de prácticas que le provee un incentivo económico más alto.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestra los resultados preliminares del modelo logaritmo condicional, que presenta coeficientes negativos asociados a cada atributo, lo que indica que un coeficiente más alto se asocia a una menor probabilidad de seleccionar la BPA, tal como se presenta en el estudio, Es decir, la adopción de las BPA asociada a una utilidad marginal negativa, la DAA resulta un incentivo de \$US612.23 ha/año caficultor está dispuesto a renunciar a su situación actual (estatus quo) con la finalidad de adoptar BPA aun con un incentivo menor al conjunto de todas las practicas. Estos datos representan una similitud con otros trabajos con relación a prácticas agrícolas en Nicaragua (14) aunque se diferencia que este estudio hizo una clasificación de la población por su nivel adquisitivo y las prácticas agrícolas están enfocadas en la adaptación al cambio climático.

4. CONCLUSIONES

Este estudio aporta los lineamientos necesarios para poder desarrollar políticas de gestión para la conservación de SAF de café, los cuales representan una importancia económica, ambiental y social para la República Dominicana. Parte de este estudio también ofrece herramientas para comenzar un proceso de transición de la producción convencional a una producción sostenible y finalmente con esto queda demostrado que se pueden proponer soluciones objetivas y adaptadas a las realidades de los caficultores.

5. REFERENCIAS

1. Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, et al. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. Food Secur. 2015 Apr 1;7(2):303–21.
2. Ramirez-Camejo LA, Eamvijarn A, Diaz-Valderrama JR, Karlsen-Ayala E, Koch RA, Johnson E, et al. Global Analysis of Hemileia vastatrix Populations Shows Clonal Reproduction for the Coffee Leaf Rust Pathogen Throughout Most of Its Range. Phytopathology. 2022 Mar 1;112(3):643–52.

3. Peguero Felipe ROSP. Desempeño financiero y económico de alternativas de rehabilitación y renovación (R&R) de los cafetales agroforestales de la República Dominicana. CATIE - Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
4. Berhanu Y, Nigussie A, Jifar AA, Ahmed M, Biresaw A, Mamuye M, et al. Nitrous oxide and methane emissions from coffee agroforestry systems with different intensities of canopy closure. Science of The Total Environment. 2023 Jun;876:162821
5. Lugo-Pérez J, Hajian-Forooshani Z, Perfecto I, Vandermeer J. The importance of shade trees in promoting carbon storage in the coffee agroforest systems. Agric Ecosyst Environ. 2023 Oct 1;355.
6. Adriana L, Gallo V. Capítulo VI Buenas prácticas agrícolas (BPA). 2012.
7. Pham HG, Chuah SH, Feeny S. Coffee farmer preferences for sustainable agricultural practices: Findings from discrete choice experiments in Vietnam. J Environ Manage. 2022 Sep 15;318.
8. PROYECTA, "Caracterización biofísica de Las Cuencas Altas de la Presa De Sabana Yegua. Informe Final Elaborador por Fondo Mundial para el Medio Ambiente, 2007. 12: 2.
9. Elena N, Monsalve E, Daniel Gómez Zapata J. Experimentos de elección: una metodología para hacer valoración económica de bienes de no mercado*.
10. Hernández Díaz-Ambrona. Metodología para el monitoreo y evaluación de buenas prácticas en agricultura para la adaptación al cambio climático y la gestión integral del riesgo de desastres. FAO y UPM; 2021.
11. Van Cranenburgh S, Collins AT. New software tools for creating stated choice experimental designs efficient for regret minimization and utility maximization decision rules. Journal of Choice Modelling. 2019 Jun 1;31:104–23.
12. Guerrero EM, Laguna RR, Martínez Damián MÁ, Ortíz JH, Zárate RR. Basic considerations for the application of discrete choice experiments: a review. Vol. 11, Revista Mexicana de Ciencias Forestales. National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research; 2020.
13. Mcfadden D. P259-312 [Internet]. 2001. Available from: elsa.berkeley.edu/~mcfadden.P259-31222/12/0312:25Página261http://www.nobelprize.org
14. Bro AS. Climate Change Adaptation, Food Security, and Attitudes toward Risk among Smallholder Coffee Farmers in Nicaragua. Sustainability (Switzerland). 2020 Sep 1;12(17).

Figura 1. Ejemplo ficha de conjunto de elección

Bloque No. ____ Escenario No. ____	Grupo de Prácticas 1	Grupo de Prácticas 2	Situación actual /SQ
Reservorio de agua			
Fertilización mineral eficiente /Fertilización orgánica			
Control biológico			
Fumigación con bioles			
Rotación con leguminosa			
Diversificación			
Incentivo dólares por hectárea por año (Duración 5 años)	200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600	200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600	
Elecciones (Marcar X)	☒	☒	☒

Tabla 1. Resultados Logaritmo Condicional (LC) y Disposición a Aceptar (DAA)

Atributo	LC			DAA		
	Coef.	SE	Z	US\$/ha/año	SE	Z
SQ	-1.83***	0.275	-6.36	346.10	71.4	4.5
Reservorio de agua	-0.47***	0.099	-4.76	89.83	18.5	4.52
Fertilización mineral eficiente	-0.42***	0.107	-3.96	80.88	18.58	4.05
Fertilización orgánica	-0.51***	0.107	-4.68	95.73	20.7	4.29
Control biológico	-0.38***	0.090	-4.15	72.29	14.7	4.58
Fumigación con bioles	-0.57***	0.093	-6.09	108.21	19.07	5.28
Rotación con leguminosa	-0.85***	0.102	-8.10	159.29	19.76	7.5
Diversificación	-0.03***	0.080	-0.33	5.05	14.26	0.33
Incentivo	0.005***	0.001	10.32			
N	238					
Log-Likelihood (LL)	-1003.17					
LR chi2	1182.30					
Prob > chi2	0.000					
Pseudo R2	0.38					
Akaike Information Criterion (AIC)	1.960.15					
Bayesian Information Criterion (BIC)	2.017.3					

***Statistically significant at a level of 0.01 **Statistically significant at a level of 0.05

*Statistically significant at a level of 0.1



Universidad
Politécnica
de Cartagena

ediciones
UPCT