

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



**Escuela Superior de Apan**

## **TESIS DE LICENCIATURA**

Caracterización parcial de las semillas de *Agave salmiana* subsp. *salmiana* Otto ex Salm-Dyck y el efecto de microondas sobre su germinación

**Para obtener el título de**

Licenciada en Ingeniería en Biociencias

**P R E S E N T A**

Nazareth García Chávez

**Director**

Dra. Teresa Romero Cortes

**Codirector**

Dr. Victor Hugo Pérez España

**Comité tutorial**

Apan, Hgo., México a 15 de marzo de 2024





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
Escuela Superior de Apan  
Campus Apan

Apan, Hgo., a 06 de marzo de 2024  
Número de control: ESAP-119/2024  
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado  
Directora de Administración Escolar  
**PRESENTE**

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias Nazareth García Chávez (338738), a quienes les presenté el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Caracterización parcial de las semillas de *Agave salmiana* subsp. *salmiana* Otto ex Salm-Dyck y el efecto de microondas sobre su germinación”**, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dra. Teresa Romero Cortes

SECRETARIO: Dr. Victor Hugo Pérez España

PRIMER VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SEGUNDO VOCAL: Dr. Luis Alberto Hernández Hernández

TERCER VOCAL: Dr. Martín Peralta Gil

SUPLENTE 1: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

SUPLENTE 2: Dr. Arturo Hernández Hernández

ATENTAMENTE  
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Jorge Zuno Silva  
Director de la Escuela Superior de Apan

Carretera Apan-Calpulalpan Km. 8,  
Colonia Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo; C.P. 43900  
Teléfono: 771 71 72000 ext. 5800, 5801  
esap@uaeh.edu.mx



[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

*Dedicada a*

*Mis padres y hermana por su apoyo constante, comprensión y amor.*

*A mi directora de tesis la Dra. Teresa Romero Cortes por compartir su tiempo y conocimientos conmigo, y por creer en mí para la realización de este proyecto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dra. Teresa Romero Cortes por su apoyo en todo momento, por compartir sus conocimientos y experiencia, por su confianza y paciencia. Infinitas gracias.
- A el Dr. Víctor Hugo Pérez España por su contribución en el desarrollo de este proyecto.
- A el Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra por su constante apoyo y sugerencias.
- A el Dr. Martin Peralta Gil también por su infinito apoyo para la realización de gran parte de este proyecto.
- A la Dra. Itria Ibba y al Mtro. José Fausto Cervantes investigadores del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de la parte experimental de este proyecto. Infinitas gracias.

## RESUMEN

Las semillas de *Agave salmiana* subsp. *salmiana* son lacrimiformes, planas y de color negro brillante. En biología la dormancia de semillas es fenómeno que impide o retrasa la germinación, cuando las condiciones internas o externas no son las adecuadas. En este trabajo se buscó acelerar el proceso de germinación de las semillas de *A. salmiana* mediante la estimulación con microondas. Se aplicaron cinco tratamientos a diferentes tiempos. Las semillas se caracterizaron bioquímicamente. El tamaño de las semillas y el germen fue de 8 y 6 mm, y 5 y 1 mm, de largo y de ancho, respectivamente. La composición química mostró un extracto etéreo del 7.5%, una humedad del 10.1%, el contenido de carbono fue del 62-69% y el oxígeno fue del 22-24%. Estos parámetros se mantuvieron constantes antes y después de los tratamientos, y no se observaron cambios en la microestructura de la semilla, cuando se realizaron las mediciones con el microscopio electrónico de barrido (MEB). Por otro lado, la proteína total, las proteínas estructurales (albumina) y de reserva (globulina, prolamina, glutelina) y el contenido de glucosa, mostraron cambios importantes que se evidenciaron en el desarrollo y crecimiento la plántula.

## ABSTRACT

*Agave salmiana* ssp. *salmiana* seeds are lacrimyform, flat, and shiny black. In biology, seed dormancy is a phenomena that prevents or delays germination, when internal or external conditions are not appropriate. In this work we sought to accelerate the germination process of the *A. salmiana* by microwave stimulation. Five treatments were applied at different times. The seeds were characterized biochemically. The size of the seeds and germ was 8 and 6 mm, and 5 and 1 mm, in length and width, respectively. The chemical composition showed ether extract of 7.5%, humidity of 10.1%, carbon content was 62-69% and oxygen were 22-24%. These parameters remained constant before and after the treatments, and no changes were observed in the microstructure of the seeds when measurements were made with the scanning electron microscope (SEM). On the other hand, total protein, structural proteins (albumin) and reserve proteins (globulin, prolamin, glutelin) and glucose content, showed important changes that were evident in the development and growth of the seedling.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE TABLAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
CAPÍTULO I .....	14
1. Generalidades de los agaves. ....	14
1.1 Características biológicas.....	14
1.2 Usos de los agaves. ....	15
1.3 Maguey pulquero. ....	16
1.4 Nutrición. ....	16
1.5 Reproducción. ....	16
1.6 Formación de las semillas.....	17
1.6.1 Desarrollo de las semillas de <i>A. salmiana</i> .....	18
1.6.2 Germinación de las semillas. ....	20
1.7 Composición bioquímica de las semillas.....	21
1.7.1 Proteínas en semillas. ....	21
1.7.1.1 Albuminas.....	22
1.7.1.2 Globulinas.....	23
1.7.1.3 Prolaminas. ....	23
1.7.1.4 Glutelinas.....	23
1.7.2 Lípidos en las semillas. ....	23
1.7.3 Carbohidratos en las semillas.....	24
1.8 Condiciones de germinación de las semillas de <i>A. salmiana</i> . ....	25
1.8.1 Estimulación para la germinación de semillas. ....	25
1.9 Radiación. ....	26
1.9.1. Radiaciones ionizantes. ....	27
1.9.2 Radiaciones no ionizantes. ....	27
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS .....	30
CAPÍTULO II.....	31

OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	31
CAPÍTULO III .....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 Obtención de la muestra.....	32
3.2 Tamaño de las semillas. ....	33
3.3 Determinación de la humedad de las semillas. ....	33
3.4 Tratamiento con microondas.....	33
3.5 Determinación de humedad de las semillas irradiadas. ....	33
3.6 Pruebas de viabilidad y germinación de las semillas irradiadas. ....	34
3.6.1 Seguimiento y evaluación de las semillas irradiadas germinadas.....	34
3.7 Obtención de extracto etéreo (grasa total) de las semillas.....	34
3.8 Extracción y cuantificación de proteína total de las semillas desengrasadas y sin desengrasar.....	36
3.8.1 Extracción fraccionaria de proteínas de <i>A. salmiana</i> . ....	36
3.8.1.1 Extracción de albúminas.....	36
3.8.1.2 Extracción de globulinas. ....	37
3.8.1.3 Extracción de prolaminas. ....	37
3.8.1.4 Extracción de glutelinas.....	37
3.8.2 Electroforesis.....	37
3.9 Cuantificación de azúcares reductores (DNS). ....	38
3.10 Observación de la microestructura de las semillas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).....	38
3.11 Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).....	39
CAPÍTULO IV .....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
4.1 Tamaño de las semillas de <i>A. salmiana</i> . ....	40
4.2 Determinación de la humedad de las semillas. ....	41
4.3 Peso de las semillas tratadas con microondas.....	41
4.3.1 Determinación de la humedad en las semillas después del tratamiento. ....	42
4.4 Germinación <i>in vitro</i> . ....	42
4.4.1 Seguimiento y evaluación <i>in vitro</i> de las semillas germinadas e irradiadas. ....	42



4.4.2 Seguimiento y evaluación <i>in vivo</i> de las semillas germinadas e irradiadas. ....	43
4.5 Composición bioquímica de las semillas.....	45
4.5.1 Obtención de extracto etéreo (grasa total) de las semillas. ....	45
4.6 Extracción y purificación de proteínas. ....	46
4.6.1 Cuantificación de proteína total (Método Bradford).....	46
4.6.2 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE. ....	47
4.7 Contenido de azúcares reductores (DNS).....	49
4.8 Determinación de la microestructura en MEB de las semillas irradiadas. ....	49
4.9 Análisis Estructural Elemental (EDS). ....	51
CAPÍTULO V .....	52
CONCLUSIONES.....	52
REFERENCIAS .....	53
APÉNDICE A .....	60
APENDICE B.....	61
APENDICE C.....	64
APENDICE D .....	65
APENDICE E.....	68

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Solubilidad y función de proteínas presentes en las semillas vegetales.....	22
Tabla 2 Clasificación de proteínas, basada en criterios genéticos y moleculares. ....	22
Tabla 3 Porcentaje de ácidos grasos presentes en diferentes semillas .....	24
Tabla 4 Tipos de estimulación en húmedo y en seco para la germinación de semillas.....	26
Tabla 5 Diseño experimental para evaluar el efecto de diferentes dosis de radiación sobre las semillas de <i>A. salmiana</i> . ....	33
Tabla 6 Características físicas evaluadas de las semillas de <i>A. salmiana</i> . ....	40
Tabla 7 Pesos de las semillas de <i>A. salmiana</i> antes y después de la aplicación de las microondas. ....	41
Tabla 8 Pérdida porcentual de humedad de las semillas irradiadas. ....	42
Tabla 9 Peso del extracto etéreo obtenido de las semillas de <i>A. salmiana</i> . ....	45
Tabla 10 Registro de los pesos moleculares (kDa) de las diferentes fracciones proteicas obtenidas. ....	48
Tabla 11 Diluciones empleadas en la curva patrón BSA.....	59
Tabla 12 Componentes y cantidades requeridas para el gel separador a diferentes porcentajes.....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de una planta de <i>A. salmiana</i> .....	15
Figura 2. Desarrollo de las flores y frutos de un <i>Agave</i> .....	18
Figura 3. Morfología de las semillas de <i>A. salmiana</i> . a) Semillas viables y b) forma lacrimiforme. ....	19
Figura 4. Estructura de <i>A. salmiana</i> y ubicación de sus semillas en la planta. ....	19
Figura 5. Espectro electromagnético. ....	32
Figura 6. Esquema de la metodología general.....	35
Figura 7. Ejemplificación de un equipo Soxhlet (a) y de un equipo de destilación (b) .....	41
Figura 8. Características morfológicas de la semilla y embrión de <i>A. salmiana</i> a) maguey chalqueño y b) maguey manso .....	42
Figura 9. Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de las semillas de <i>A. salmiana</i> (maguey chalqueño a 20 días.....	43
Figura 10. Proceso de germinación de semillas de <i>A.salmiana</i> (maguey chalqueño en condiciones <i>in vitro</i> .....	44
Figura 11. Efecto de los tratamientos de irradiación sobre el desarrollo de la plantula de <i>A. salmiana</i> (maguey chalqueño) .....	45
Figura 12. Extracto etéreo obtenido de <i>A. salmiana</i> A) Maguey chalqueño y B) Maguey manso.....	46
Figura 13. Concentración proteína total en las semillas de <i>A. salmiana</i> (Maguey chalqueño) con diferentes tratamientos.....	46
Figura 14. Concentración proteína total en las semillas de <i>A.salmiana</i> (Maguey manso) con diferentes tratamientos.....	47
Figura 15. Proteína total en las semillas de <i>A. salmiana</i> / maguey chalqueño y maguey manso desengrasadas y sin desengrasar.....	48
Figura 16. Patrón electroforético de las fracciones proteicas de las semillas de <i>A. salmiana</i> / Maguey chalqueño.....	49
Figura 17. Concentración de azúcares reductores (mg/mL) de las muestras de semillas de <i>A. salmiana</i> / Maguey chalqueño con diferentes tratamientos .....	50
Figura 18. Micrografías (MEB) a diferentes aumentos (a) 350, (b) 1300 y (c) 2500 de las semillas de <i>A.salmiana</i> / Maguey chaqueño irradiadas.....	51

Figura 19. Composición elemental (%) de Carbono (C) y Oxígeno (O) en las semillas de <i>A. salmiana</i> / Maguey chalqueño con diferentes tratamientos .....	51
Figura 20. Composición elemental (%) en las semillas de <i>A. salmiana</i> / Maguey chalqueño con los diferentes tratamientos .....	60
Figura 21. Curva patrón de BSA .....	64
Figura 22. Curva patrón DNS.....	68
Figura 23. Curva patrón SDS-PAGE.....	67

## INTRODUCCIÓN

En México, el género *Agave* se encuentra representado por 155 especies, de las cuales el *Agave pulquero* (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) está ampliamente representado en el altiplano mexicano (SADR, 2016; Narváez-Suárez *et al.*, 2016). Además, constituye un recurso forestal de gran importancia para el mantenimiento de los suelos (Pérez-España *et al.*, 2022), así como para la extracción de aguamiel, a partir del cual se puede elaborar pulque y jarabe de maguey (Cuervo-Parra *et al.*, 2017). El método de propagación más común es mediante hijuelos vegetativos debido a que se desarrollan más rápidamente en comparación con las plántulas producidas por semilla.

El uso de la radiación de microondas para acelerar la germinación de semillas se ha incrementado en los últimos años (Moreno *et al.*, 2017). La radiación de microondas se asocia con ondas de menor frecuencia y mayor longitud de onda, en comparación con la radiación visible, cuyo efecto sobre la germinación de semillas ha sido estudiado en cultivos como; trigo (*Triticum aestivum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), frijol mungo (*Vigna radiate*) y frijol makusta (*Vigna aconitifolia*; (Mohammad *et al.*, 2018). En estos cultivos, se ha observado que la estimulación por radiación de microondas en un tiempo adecuado de exposición puede mejorar la germinación de las semillas, e incrementar el vigor de las plántulas. En especies de semillas con problemas de germinación, genera efectos estimulantes sin causar variaciones genéticas (Salomon-Díaz *et al.*, 2017). Esto es debido a la radio sensibilidad, una propiedad intrínseca de los seres vivos que varía dependiendo del organismo y especie (Álvarez *et al.*, 2011).

Por todo lo anterior, este trabajo tuvo por objetivo, evaluar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de microondas sobre la germinación de semillas de *A. salmiana*, así como analizar alteraciones en la composición química y estructural de las semillas derivado de cada dosis de microondas aplicada.

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1. Generalidades de los agaves.

Los *Agaves* son plantas perennes, con hojas suculentas, arregladas en espiral alrededor de un tallo central corto, con crecimiento desde herbáceo a arbóreo, con espinas marginales y una espina terminal en el ápice de cada hoja (Aedo *et al.*, 2013; Frisby *et al.*, 2018). El género *Agave* (familia Asparagaceae; Frisby *et al.*, 2018), está representada por aproximadamente 310 especies reportadas, con alrededor de 273 especies ubicadas en México, de las cuales el 55% son endémicas (Castillo *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2009; Robles & Cruz, 2023). Se distribuyen desde el sur de Canadá, México, Centro y Sudamérica (siguiendo principalmente la cadena montañosa de los Andes hasta Bolivia y Paraguay) e islas del Caribe y en menor presencia en la zona meridional y occidental de los Estados Unidos de Norteamérica (García & Galván, 1995). Estas plantas, se encuentran adaptadas principalmente a climas áridos, donde se ubican en matorrales, pastizales, bosques de pino y encino, selvas secas y húmedas, o ambientes más extremos como suelos rocosos (CONABIO, 2021).

#### 1.1 Características biológicas.

Los *Agaves*, son plantas monocotiledóneas y hermafroditas, es decir, que cuando germinan producen un solo cotiledón a partir del cual emergen todas las hojas. Las plantas, tienen forma de piña, de donde se desarrollan las hojas, que comúnmente reciben el nombre de pencas. Mismas que pueden ser, rectas o dobladas, carnosas, de bordes espinosos y con una púa al final de cada hoja. Su inflorescencia o quiote, llega a medir hasta 12 metros, este tamaño va a depender de la especie de *Agave* y de las condiciones ambientales a las que cada planta haya estado expuesta durante su ciclo de vida (Figura 1). El color de los *Agaves* va desde el verde claro hasta el verde oscuro casi púrpura, pasando por varios tonos de azul (SIAP, 2017).

El tiempo de vida de los *Agaves* depende de la especie, variando desde los cinco hasta los setenta años, antes de que la planta produzca su quiote o escapo floral. Las flores del quiote ofrecen néctar a insectos, aves y murciélagos, mismos que polinizan dichas flores con el polen de otros individuos de su misma especie (CONABIO, 2021). La capacidad de almacenar agua por unidad de área de transpiración o succulencia es una propiedad crucial para la supervivencia

de este tipo de plantas. Por tanto, cuanto más se desarrollen las plántulas, podrán sobrevivir a periodos de sequía (Cundapi-Gómez, 2012).

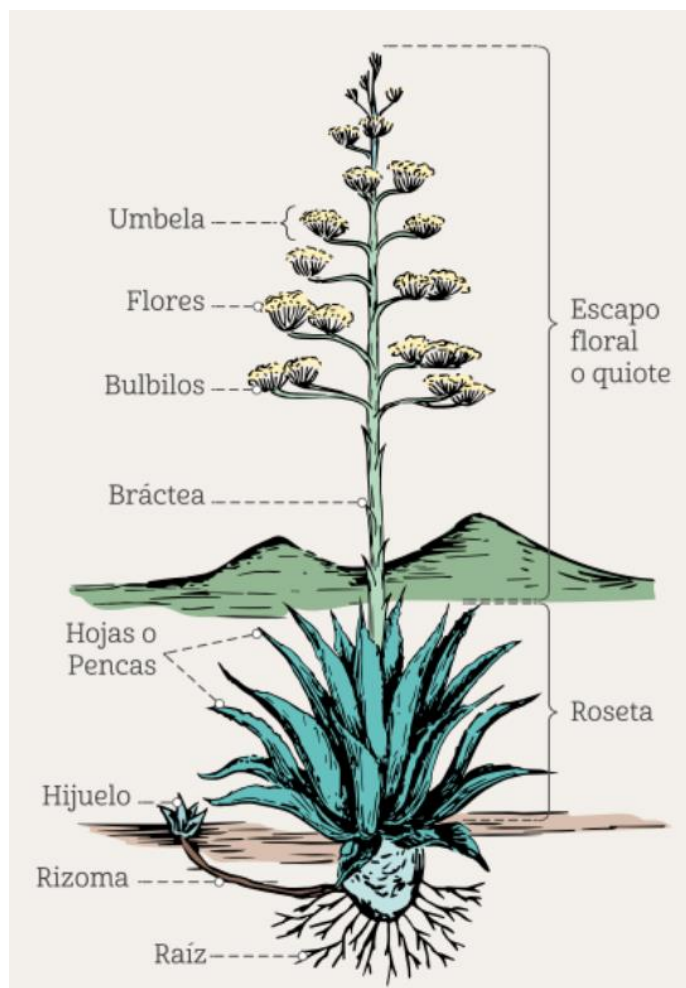


Figura 1. Morfología general de una planta de *A. salmiana*.

## 1.2 Usos de los agaves.

Las plantas del género *Agave* han sido de gran importancia para los habitantes de Mesoamérica desde hace unos 10,000 años (Mora-López *et al.*, 2011). En México, estas plantas tienen usos variados como son: alimento para ganado o para humanos (aguamiel y bebidas fermentadas o destiladas, gusanos), extracción de fibras, materiales de construcción y medicamentos (Vázquez-García *et al.*, 2016), así como para la elaboración de cercos y como cobertura viva para la retención de agua del suelo (Vázquez-García, 2018).

### **1.3 Maguey pulquero.**

Dentro del género *Agave*, las principales especies productoras de aguamiel para la elaboración del pulque son: *A. salmiana* (maguey pulquero); *A. mapisaga* (maguey blanco), *A. atrovirens* Kawr (maguey manso), *A. lehmannii* (maguey corriente), *A. cochlearis* (maguey verde) y *A. attisima jacobi* o maguey de venado (Flores-Morales *et al.*, 2009).

El maguey pulquero, se cultiva desde la época prehispánica, principalmente para la producción de aguamiel, mezcal y fibra (Cruz-Vasconcelos, *et al.*, 2020). El *A. salmiana* tiene su origen en el Altiplano Mexicano, y se cultiva desde los 1,200 a 2,500 msnm, con precipitación pluvial de 350 a 1,000 mm anuales (Flores-Morales *et al.*, 2009). Es la especie con mayor presencia en el Altiplano Central Mexicano debido a que se trata de una especie con muy buena adaptación a condiciones de baja precipitación, heladas frecuentes, así como suelos con poca fertilidad (Narváes-Suárez *et al.*, 2016).

Este maguey es de tamaño mediano a grande, con vástagos cortos, que forman rosetas de 1.5 a 2.0 m de alto. Las hojas tienen dimensiones en los rangos de 100-200 cm de largo y 20-35 cm de ancho, lineares lanceoladas, acuminadas, grueso-carnosa de color verde a grisáceo, convexas hacia la base, y cóncava o acanalada hacia la punta (Nieto-Aquino *et al.*, 2016).

### **1.4 Nutrición.**

Los *Agaves* presentan un metabolismo ácido crasuláceo (CAM), que les permite absorber CO<sub>2</sub> por las noches, evitando la deshidratación en horas de mayor calor, y asimilarlo en el ciclo de Calvin durante el día (Cruz-Vasconcelos *et al.*, 2020). Las plantas CAM exhiben tasas en la eficiencia del uso del agua cinco a diez veces más altas que las plantas C<sub>4</sub>, debido a que los estomas de las plantas CAM permanecen cerrados durante casi todo el día, resultando en una ventaja competitiva en ambientes donde el agua es un factor limitante (Geydan & Melgarejo, 2005). Estudios realizados en plantas con fotosistema CAM, han reportado niveles mayores de Ca, Mg y Mn que en la mayoría de las plantas C<sub>4</sub> (Gutiérrez, 2011).

### **1.5 Reproducción.**

*A. salmiana* desarrolla sus flores en la punta de un qurote, el cual se ramifica para dar lugar a una inflorescencia formada por un eje principal. Las flores del maguey pulquero tradicionalmente se conocen como “gualumbos”, cuando son fecundadas producen semillas



que se dispersan a través del viento y por otros factores ambientales. La gran mayoría de las especies del género *Agave* mueren una vez que concluye su ciclo de floración y reproducción sexual.

Los *Agaves* tienen otras formas de reproducción, la asexual: por medio de bulbillos y por hijuelos. Los primeros se forman en las ramas del quiote a partir de una yema que al desarrollarse da lugar a bulbillos o retoños, mientras que los segundos son retoños más vigorosos que nacen a partir de los rizomas de la planta (propágulos de rizoma). Tanto los bulbillos con los diferentes tipos de hijuelos son genéticamente idénticos a la planta madre (CONABIO, 2021).

La forma más común de propagación de los *Agaves* cultivados (ya sea para la producción de pulque, mezcal o tequila) es de manera asexual, debido a las prácticas agrícolas ancestrales de los productores de *Agave*. Esta práctica consiste en separar a los hijuelos de la planta madre, después de que han alcanzado entre 30 y 50 cm de altura y una longitud entre 5 y 8 cm de las hojas. Los hijuelos emergen de la planta madre después del primer año de plantación, y pueden ser plantados directamente en la tierra bajo condiciones naturales, o mantenerse en condiciones de invernadero hasta que alcancen el tamaño adecuado para ser trasplantado a la tierra en campo. (Cundapi-Gómez, 2012).

### **1.6 Formación de las semillas.**

Las semillas de las angiospermas se componen generalmente de: a) embrión, endospermo y testa.

- a) Embrión: es resultado de la fecundación de la célula huevo por la célula espermática masculina.
- b) Endospermo: surge de la fecundación y fusión de los dos núcleos de la célula central con el núcleo masculino. Las semillas almacenan en células del endospermo las moléculas de reservas necesarias para el crecimiento de la planta como: carbohidratos, aceites y proteínas (Ángeles *et al.*, 2017).
- c) Testa: la capa externa de la semilla que es la barrera protectora entre el embrión y el ambiente externo.

El desarrollo de una semilla comprende tres fases principales: 1) diferenciación y formación del embrión, 2) acumulación de sustancias de reserva, y 3) maduración y deshidratación (Pita-Villamil & Pérez-García, s.f ; Mantilla, 2008).

### 1.6.1 Desarrollo de las semillas de *A. salmiana*.

Este proceso de desarrollo de las semillas inicia cuando el centro del *Agave* maduro, periodo que tarda entre 6 y 25 años dependiendo de la especie (SAGARPA, 2017; CONVITE, 2019), se adelgaza y acumula azúcares necesarios para el desarrollo de su quiote, conforme el quiote crece le brotarán las ramas que sostendrán los racimos de sus flores (Figura 2).

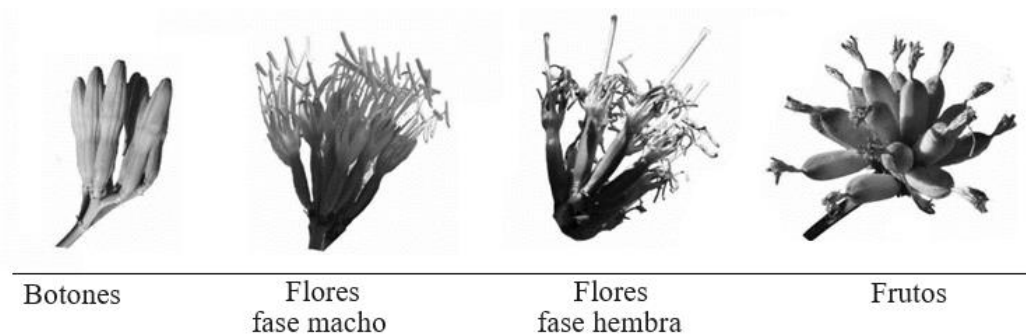


Figura 2. Desarrollo de las flores y frutos de un *Agave* (Granich *et al.*, 2018).

Las flores tienen diferente tiempo de desarrollo, las ramas inferiores del quiote son las primeras en abrir, posteriormente las de en medio y por último las de la punta. En las flores se encuentran los órganos reproductores (masculino y femenino) de la planta. En los *Agaves* apenas la flor se abre se desarrollan las anteras o estambres (parte masculina) donde se produce el polen, más adelante las anteras se secan y al mismo tiempo se madura el estilo, el estigma y los ovarios (parte femenina) que se encontraban ocultos en la base de la flor. Aunque la flor tiene ambos órganos reproductores, por lo general no se auto fecunda, si no que, es fecundada por polinizadores externos como murciélagos, abejas, mariposas, y colibríes, principalmente (Trejo-Salazar *et al.*, 2015; Gómez-Ruiz, 2020). Estos polinizadores depositan el polen en los estigmas de la planta, el cual entra a los estilos hasta llegar al fondo y fecunda los óvulos, desencadenando la formación de las semillas. Las semillas de *A. salmiana* son lacrimiformes, planas y de color negro brillante (Figura 3; Gutiérrez *et al.*, 2020).

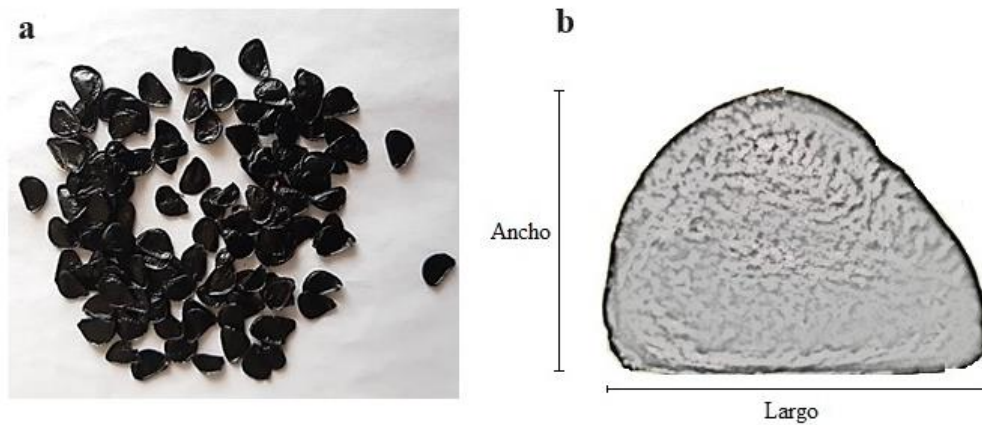


Figura 3. Morfología de las semillas de *A. salmiana* subsp. *salmiana*. a) Semillas viables y b) forma lacrimiforme.

Una vez fecundados los óvulos, se forman las semillas dentro del ovario y se desarrolla el fruto, mientras que las partes de las flores restantes secas se caen. Cada fruto aloja aproximadamente trescientas semillas; sin embargo, muy pocas germinan. Esto debido a que no todas son viables, es decir, algunas semillas son vanas (semilla que carece de embrión), otras son consumidas por animales o caen en sitios desfavorables para su crecimiento (Figura 4; Granich *et al.*, 2018).

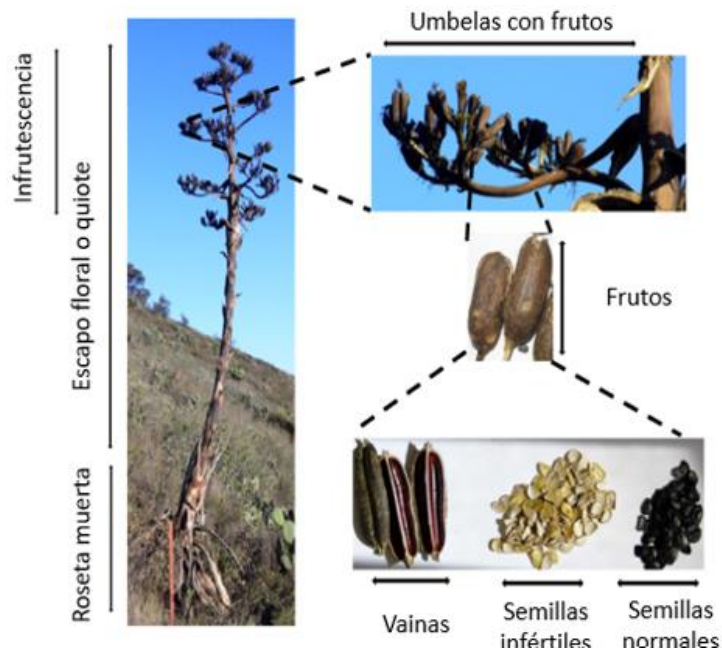


Figura 4. Estructura de *A. salmiana* subsp. *salmiana* y ubicación de sus semillas en la planta.

### **1.6.2 Germinación de las semillas.**

Cuando la embriogénesis se completa, la semilla comienza a acumular reservas que permitirán nutrir al embrión durante la germinación de la plántula. Durante la fase de maduración, la semilla se deseca y el ciclo celular se suprime, entra a una fase conocida como dormancia, considerado simplemente como un bloqueo de la germinación de una semilla viable. Este bloqueo previene que la semilla germine en condiciones desfavorables y que lo haga cuando existan condiciones óptimas, además, ayuda a la dispersión de estas (Penfield, 2017).

La germinación comienza con la hidratación de la semilla seca, seguida por el crecimiento y expansión del embrión. La hidratación se puede dividir en tres fases: a) inicia con una ingesta de agua rápida, b) posteriormente la absorción llega a un periodo de estacionamiento, durante el cual se comienza la actividad metabólica y c) finalmente ocurre un incremento en la tasa de hidratación; mientras que el embrión se elonga, rompe el endospermo y la testa para completar la germinación. Además de los requerimientos de agua, las semillas también son sensibles a otros factores como, temperatura, luz, así como de las concentraciones de oxígeno, nitrato y fitohormonas (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

En este sentido el papel de las fitohormonas, como el ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA), ha sido ampliamente estudiados, es considerado clave en el control de la dormancia y germinación. (Carrillo, 2016; Alcantara *et al.*, 2019) La presencia del ABA es necesaria para prevenir los procesos relacionados con la germinación. Por el contrario, las plantas deficientes en la producción o percepción de GA son incapaces de germinar, a menos que se remueva la cubierta y el endospermo. Es decir, ambas hormonas actúan de manera antagonista (Penfield, 2017).

Durante y después de la germinación, el crecimiento temprano de la plántula es impulsado por el catabolismo de las reservas acumuladas de proteínas, aceites y almidón acumulado durante la maduración. Estas reservas permiten la expansión celular, el desarrollo de cloroplastos y el crecimiento de la raíz hasta que el crecimiento fotoautótrofo pueda ser establecido (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Penfield, 2017).

## **1.7 Composición bioquímica de las semillas.**

Las semillas tienen componentes de reserva que consisten en proteínas, carbohidratos y lípidos, la proporción y localización de estos compuestos varía de acuerdo con la especie (Granich *et al.*, 2018).

### **1.7.1 Proteínas en semillas.**

Las proteínas son moléculas grandes y complejas formadas por una o más cadenas lineales o plegadas de aminoácidos. Los aminoácidos son moléculas formadas por un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) y un grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ), enlazados al mismo carbono (C) de la molécula y están unidos por un enlace peptídico (enlace de un grupo amino con un carboxilo perteneciente a otro aminoácido; González-Torres *et al.*, 2007). La cantidad de proteína presente en las semillas en peso seco, varía entre 10% en cereales, a 40% en ciertas leguminosas y oleaginosas (Latham, 2002; Curtis, 2013; González, 2020), constituyendo una importante fuente de proteína dietética. La gran mayoría de las proteínas en las semillas maduras tienen funciones metabólicas o estructurales. Además, todas las semillas contienen uno o más grupos de proteínas en grandes cantidades, que sirven como reserva de aminoácidos para su uso durante la germinación y el posterior crecimiento de las plántulas. Las proteínas de almacenamiento son de vital importancia, determinan el contenido total de proteína de la semilla y la calidad para diversos usos. Se ha observado que, la proporción baja de aminoácidos en las proteínas de almacenamiento (lisina, treonina, triptófano y cisteína) en algunas semillas de cereales (García-Rodríguez *et al.*, 2017) y en semillas de leguminosas (lisina, treonina, triptófano, cisteína y metionina), limitan la calidad nutricional cuando se utilizan estas semillas como alimento para animales monogástricos (Shewry *et al.*, 1995). En el caso del trigo, las proteínas de almacenamiento forman la fracción de gluten, que favorece la elaboración de pan y pastas (Correa-Navarro *et al.*, 2017).

Las proteínas presentes en las semillas pueden tener diferentes funciones y pueden estar metabólicamente activas (enzimas y nucleoproteínas) o inactivas (estructurales o de reserva). Además, se pueden diferenciar en base a su solubilidad en cuatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas (Tabla 1).

Tabla 1. Solubilidad y función de proteínas presentes en las semillas vegetales.

Tipo de proteína	Solubilidad	Función
Albuminas	Solubles en agua	Estructural
Globulinas	Solubles en soluciones salinas	Reserva (Dicotiledóneas)
Prolaminas	Solubles en soluciones acuosas de etanol	Reserva (Cereales)
Glutelinas	Solubles en soluciones de ácidos y bases diluidas	Reserva (Cereales)

(Shewry *et al.*, 1995).

Las proteínas se clasifican en base a criterios genéticos y moleculares, basada en la estructura genética, en homologías de la estructura primaria y en su acumulación dentro de la semilla (Fukushima, 1991). De esta forma, es posible dividir las proteínas en dos grandes grupos: prolaminas (engloba a las albúminas) y glutelinas (engloba las globulinas; Tabla 2). Aunque las glutelinas y las globulinas tienen patrones distintos de solubilidad, las secuencias primarias tienen una identidad del 32 al 37%, ambas se sintetizan a partir de un precursor grande y se procesan proteolíticamente en un polipéptido ácido y otro básico; además, de que ambas se acumulan y almacenan en vacuolas (Katsube *et al.*, 1999).

Tabla 2. Clasificación de proteínas, basada en criterios genéticos y moleculares.

Criterio	Globulinas	Prolaminas
Mecanismo de acumulación	Vacuola	Directa
Estructura genética	Con intrones	Sin intrones
Secuencia de aminoácidos	Sin estructuras repetidas	Con estructuras repetidas

(Fukushima, 1991)

### 1.7.1.1 Albuminas.

Son proteínas que se ubican principalmente en el citoplasma del embrión, no son constituyentes del gluten y proveen azufre a la semilla durante la germinación. En la mayoría de las semillas de tipo leguminosa, las albuminas son una fuente buena de lisina y aminoácidos azufrados, principalmente la metionina (Oliveros, 2012). La función principal de las albuminas es la reserva de nutrientes, sin embargo, se ha observado actividad biológica como inhibidores de proteasas y como proteínas de defensa (López *et al.*, 2016).

### **1.7.1.2 Globulinas.**

Proteínas de reserva presentes en especies monocotiledóneas (incluyendo cereales) y dicotiledóneas. Las globulinas pueden representar entre el 10% del total de proteínas presentes en semillas de cereales y más del 85% en semillas de leguminosas. Las globulinas se pueden clasificar en base a su coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa, en globulinas 7S y 11S (Oliveros, 2012). Las globulinas poseen grandes cantidades de ácido glutámico, ácido aspártico, leucina y amidas, además de tener un alto porcentaje de nitrógeno (Cubero-Salmerón & Moreno, 1983).

### **1.7.1.3 Prolaminas.**

Las prolaminas son proteínas presentes en la familia de gramíneas y están constituidas por grandes cantidades de prolina y nitrógeno amídico proveniente de la glutamina (aminoácido presente en grandes cantidades), y que juntos representan aproximadamente la mitad del nitrógeno total del grano. La excepción a esta regla es la avena y el arroz, en los que, las principales proteínas de almacenamiento son las globulinas 11S, y las prolaminas se presentan en niveles bajos (Corzo-Ríos *et al.*, 2003).

### **1.7.1.4 Glutelinas.**

Son proteínas constituyentes del gluten, se encuentran en baja proporción y son las encargadas de conferir propiedades reológicas (viscosidad y elasticidad) a los alimentos (Shewry *et al.*, 1995)

## **1.7.2 Lípidos en las semillas.**

Las semillas, en general, son una fuente de compuestos lipídicos como: ácidos grasos, tocoferoles, triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Entre sus componentes, destacan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL): componentes que participan en procesos fisiológicos, cumpliendo un papel estructural. Entre los AGPICL se encuentran dos grupos principales; los ácidos grasos omega-3 y omega-6. El primer representante de los ácidos grasos omega-3 es el ácido alfa-linolénico (C18:3), el cual se puede transformar en el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y posteriormente en el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA). A su vez, el primer exponente de los ácidos grasos omega-

6 es el ácido linoleico (C18:2) y uno de sus derivados más importantes es el ácido araquidónico (C20:4, AA). El AA, el EPA y el DHA son importantes componentes estructurales de los fosfolípidos de las membranas y son el sustrato para la formación de una serie de derivados lipídicos llamados eicosanoides y docosanoides, los cuales son importantes para el metabolismo celular (Valenzuela., 2011). De manera general, el contenido de los ácidos grasos en las semillas es variable (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos presentes en diferentes semillas.

Semilla	Porcentaje
Tuna	7-15 %
Girasol	32-42 %
Cártamo ( <i>Elettaria cardamomum</i> )	71.4 %
Sésamo	25.5 %
Lino	22.4 %
Algodón	20-25 %
Soja ( <i>Glycine max L.</i> )	19.74 %
Uva	8-12 %
Mango	8-15 %
Semilla de maguey	No reportado

Elaboración propia

### 1.7.3 Carbohidratos en las semillas.

Los carbohidratos son las principales reservas de energía en las semillas, conforman la pared celular y son indispensables en el metabolismo celular (Vargas-Vázquez *et al.*, 2020) Se clasifican en solubles (mono, di y oligosacáridos) y no solubles (polisacáridos) como el almidón, la celulosa y pectina. Los materiales de reserva de las semillas se pueden almacenar en el embrión o en los tejidos extraembrionarios como el endospermo, en especies como las leguminosas las proteínas y los carbohidratos se encuentran en los cotiledones.

El almidón y la hemicelulosa son los dos tipos de carbohidratos de reserva en los cereales y las leguminosas. El almidón se encuentra en cuerpos subcelulares denominados granos de almidón que comúnmente presentan una forma esférica o elíptica dependiendo la especie, esta forma depende de la cantidad de amilosa (polímero que constituye el almidón) es decir mientras más redondeados sean los granos, mayor cantidad de amilosa poseen (Casasola, 2009). Por otro lado, existen semillas que contienen otro tipo de carbohidratos que no cumplen



funciones de almacenamiento como los mucilagos que ayudan a recubrir la testa de algunas semillas y que se cree que ayudan a la dispersión y fijación de las semillas al sustrato.

### **1.8 Condiciones de germinación de las semillas de *A. salmiana*.**

La germinación de las semillas de los *Agaves* depende de factores intrínsecos (origen, tamaño, entre otros) y extrínsecos (luz, agua, oxígeno, entre otros), donde la modificación de esos factores puede ayudar a que el tiempo de germinación sea menor, así como también la tasa de germinación sea mayor (Angeles *et al.*, 2017).

Al respecto, Ramírez-Tobías *et al.* (2015), evaluaron varias temperaturas para promover la germinación de semillas de *A. salmiana*, y determinaron que a una temperatura de 25°C el porcentaje de germinación fue del 85%, mientras que, a temperaturas de 10, 35 y 40°C fueron parcialmente letales para las semillas. Igualmente, Ramírez-Tobías *et al.* (2014) reportaron que la germinación de semillas de *A. salmiana* con baja disponibilidad de agua, a una temperatura constante de 25°C y en ausencia de luz tuvieron rendimientos de entre 85% en un intervalo de 80 a 180 h, concluyendo que la germinación se ve moderadamente afectada por la baja disponibilidad de agua.

Por su parte Puente-Garza *et al.* (2015) en un estudio sobre la germinación *in vitro* de *A. salmiana* en condiciones de temperatura de 27°C y fotoperiodos de 12:12 (12 h con una iluminación de 6600 lux y 12 h en oscuridad), en el cual se aplicaron cuatro tratamientos a las semillas: 1) escarificación química 2) sin escarificación 3) escarificación mecánica y 4) escarificación química - mecánica en cultivo de medio sólido Murashige y Skoog (MS), reporto que, el 90% las semillas tratadas con escarificación mecánica germinaron al día 4 siendo este tratamiento el que dio mejor resultados.

#### **1.8.1 Estimulación para la germinación de semillas.**

La latencia o dormancia es un fenómeno que impide o retrasa la germinación de las semillas debido a que los factores internos (un embrión inmaduro, testa impermeable) o externos (agua, luz, temperatura) no son los apropiados (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015). Por lo general, la germinación de las semillas ocurre una vez que el tegumento se ha vuelto permeable. Algunas técnicas utilizadas para acelerar el proceso de germinación de algunas semillas de interés son,

la estimulación en húmedo (Tabla 4), la estimulación en seco (Castillo-Quiroz *et al.*, 2018) y la radiación (Chapín, 2016).

Tabla 4 Tipos de estimulación en húmedo y en seco para la germinación de semillas.

Tipo	Proceso en húmedo	Fuente
Tratamiento con agua	Inmersión de las semillas en agua durante un periodo de 12 a 24 h. Inmersión de las semillas en agua hirviendo, una vez dentro del agua retirar la fuente de calor y dejar reposar durante un periodo de 12 a 24 h dejando enfriar progresivamente el agua.	(Doran <i>et al.</i> , 1983)
Escarificación química	Inmersión de las semillas en sustancias corrosivas como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico concentrado por un periodo de tiempo determinado.	(Godínez Álvarez & Flores Martínez , 2000)
Tipo	Proceso en seco	Fuente
Escarificación mecánica	Fricción de las semillas con lija o la aplicación de un corte en la testa con ayuda de un agente filoso.	(Tigabu & Oden, 2001)
Calor seco	Exposición de las semillas a temperaturas muy elevadas durante un tiempo determinado.	(Doran <i>et al.</i> , 1983)
Radiación	Exposición de las semillas a radiación (microondas) durante un tiempo determinado.	(Armesto-Arenas <i>et al.</i> , 2015)

## 1.9 Radiación.

La radiación electromagnética o también conocida como ondas electromagnéticas, se conoce como el conjunto de perturbaciones eléctricas y magnéticas que se disipan desde un origen y se desplazan a través del espacio. Las ondas electromagnéticas están distribuidas en el espectro electromagnético, un espectro muy grande de longitudes de onda y frecuencia. El cual incluye las ondas: de radio y televisión, de luz visible, de microondas, de radiación infrarroja, ultravioleta, de rayos X y rayos gamma (Young & Freedman, 2009).

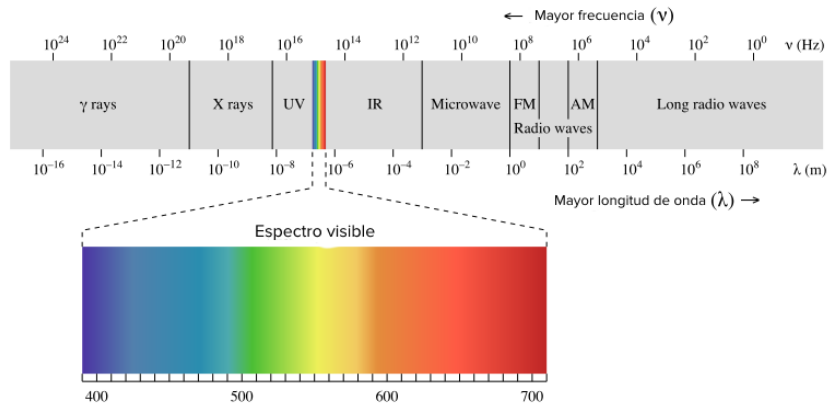


Figura 5 Espectro electromagnético

### 1.9.1. Radiaciones ionizantes.

Las radiaciones ionizantes convierten átomos neutros en iones (partículas atómicas con carga eléctrica) al sacar electrones de sus estructuras. Las radiaciones ionizantes incluyen rayos alfa, beta, gamma, y rayos X. Muñoz (1997), menciona que una radiación se denomina ionizante cuando tiene la energía suficiente para provocar la separación de uno o más electrones de un átomo o de una molécula y como consecuencia produce la liberación de grandes cantidades de energía capaz de romper los enlaces químicos de las moléculas.

### 1.9.2 Radiaciones no ionizantes.

Este tipo de radiaciones no poseen la energía suficiente para ionizar átomos, su influencia es térmica. La radiación no ionizante abarca radiaciones de frecuencias bajas, pasando por radiofrecuencia, microondas, el espectro visible hasta el rango ultravioleta. Según Ruiz (2003) a pesar de que estas radiaciones no pueden provocar la ionización de moléculas, si pueden provocar efectos de calentamiento en los sistemas biológicos y alteraciones de las reacciones químicas.

#### 1.9.2.1 Microondas.

Las microondas son aquellas radiaciones localizadas en el rango de frecuencias de 300MHz a 300GHz, Hertz (Hz), y en un rango de longitud de onda de 1m hasta 1 mm. Son consideradas una radiación electromagnética no ionizante, que se manifiesta como una energía vibratoria de las moléculas o calor. Por el contrario del calentamiento tradicional, las microondas

generan una conversión de energía electromagnética a energía térmica y no una transferencia de calor en los cuerpos con los que interactúa (Sun *et al.*, 2016).

## JUSTIFICACIÓN

Las plantas del género *Agave*, están ampliamente representadas en el territorio mexicano, dentro estas, el maguey pulquero *A. salmiana*, es una especie de gran importancia en el sector social y económico para un extenso sector de la población, debido a que a partir de ella se obtienen productos derivados de gran interés. Dentro de los productos más importantes se pueden mencionar; bebidas, forrajes, alimentos, biomasa, y setos vivos (Cuervo-Parra *et al.*, 2017). En este sentido el estado de Hidalgo dedica una superficie de 4,482 hectáreas al cultivo del maguey pulquero; Sin embargo, debido al mal manejo que se les da a las plantaciones de *A. salmiana*, la superficie de plantación actual ha disminuido de las regiones productoras (Roldan-Cruz *et al.*, 2023). Parte de este mal manejo, se debe en parte a todos los recursos que se obtienen de ellas, mismos que son de alto valor económico, social y cultural (Flores-Morales *et al.*, 2009), y no siempre se manejan de forma sustentable. Una alternativa para contrarrestar la explotación del maguey pulquero, de forma no sustentable, es su reforestación. Sin embargo, ya que los *Agaves* son plantas que requieren grandes periodos de tiempo para poder completar su desarrollo, estos programas de reforestación deben pensarse a largo plazo. En este contexto, la importancia de este estudio radica en comprobar el efecto de la radiación de microondas sobre las semillas de *A. salmiana* esto en relación con acortar el tiempo y mejorar su germinación. Fomentar el uso de semillas para la reproducción del *A. salmiana*, con el fin de mantener su diversidad genética. Además de realizar una caracterización parcial de estas semillas para analizar si la aplicación de esta radiación afecta en algo las propiedades bioquímicas de las semillas.

## **HIPÓTESIS**

- Una breve exposición a microondas reduce el tiempo de germinación de las semillas de *A. salmiana*

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar los efectos de la estimulación por radiación de microondas en la velocidad y tasa de germinación de semillas de *A. salmiana*.

#### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1) Determinar el tiempo de exposición de irradiación de microondas que genera mayor velocidad en la germinación de las semillas de *A. salmiana*.
- 2) Cuantificar las proteínas y los carbohidratos presentes en las semillas de cada uno de los tratamientos de radiación aplicados a las semillas.
- 3) Determinar el rendimiento de aceites presentes en las semillas.
- 4) Analizar la microestructura de las semillas mediante la toma de fotografías MEB y EDS.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema general, de la metodología establecida para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo de investigación (Figura 6), en el cual se incluyen: obtención de las semillas de maguey (*A. salmiana* subsp. *salmiana*), la caracterización morfológica, composición bioquímica, y los experimentos de germinación de las semillas.

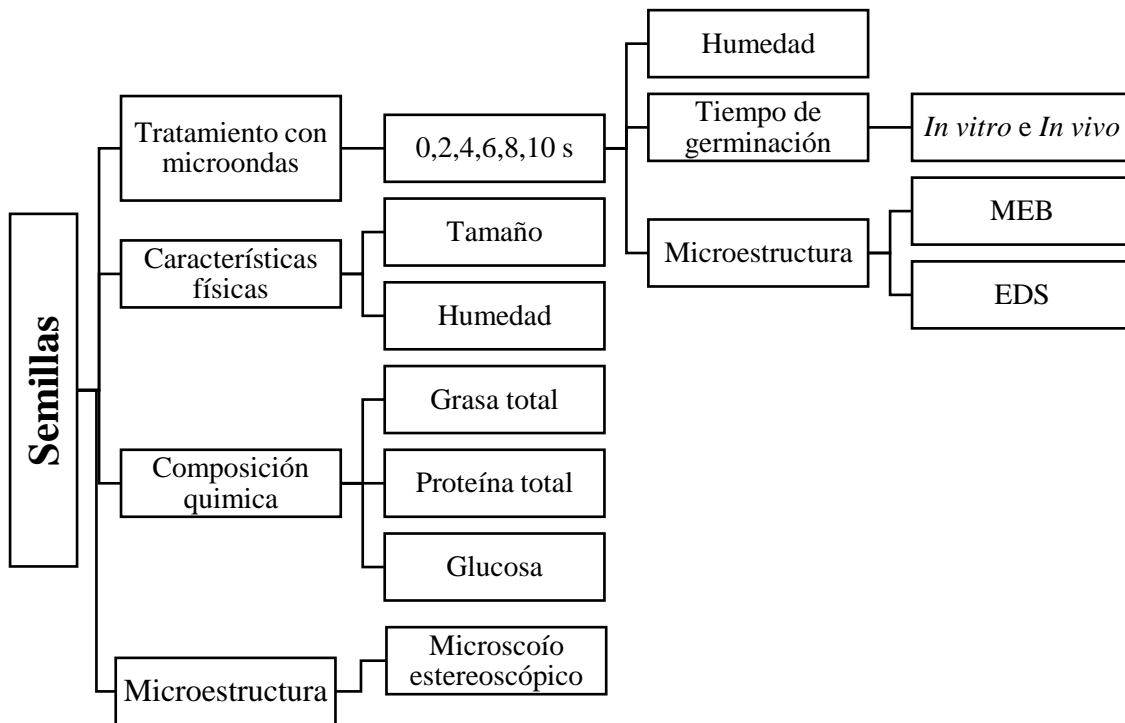


Figura 6. Esquema de la metodología general.

#### 3.1 Obtención de la muestra.

Para este trabajo, se utilizaron semillas viables (color negro) de *A. salmiana* subsp. *salmiana* y se descartaron las semillas no viables (color blanco; Mendoza-Galindo & Mora-Herrera, 2021). Se obtuvo semillas de las dos variedades de maguey pulquero (chalqueño y manso), procedentes de diferentes plantas, ubicadas de las plantaciones de maguey del Rancho “La Gaspareña” ubicado en Singuilucan, Hidalgo, México, en las coordenadas geográficas 19° 57'



59" Norte, 98° 31' 3" Oeste, con una temperatura promedio anual de 14°C y una precipitación de 647mm, a 2640 msnm (CEP, 2020).

### 3.2 Tamaño de las semillas.

Las semillas se midieron con una regla de escala 1:100 para determinar sus medidas promedio de largo y ancho, este proceso se repitió con el germen de la semilla, el cual se tuvo que extraer previamente.

### 3.3 Determinación de la humedad de las semillas.

Para determinar la humedad de las semillas de *A. salmiana*, se utilizó un equipo especializado (Marca John Deere, Modelo SW08120, Illinois, EE. UU.), en el cual se colocaron 50 g de semillas y se siguió la técnica especificada en el equipo.

### 3.4 Tratamiento con microondas.

Para los experimentos se utilizó una muestra de 66 semillas divididas en tres grupos que se sometieron al mismo tratamiento, para lo cual se utilizó un horno microondas (Marca Panasonic, Modelo NN-SD982S, Shanghái, China), con una potencia de 1,200 W. Para determinar el efecto de la radiación sobre las semillas de *A. salmiana*, se diseñó el siguiente diseño experimental (Tabla 5).

Tabla 5. Diseño experimental para evaluar el efecto de diferentes dosis de radiación sobre las semillas de *A. salmiana*.

Clave	Tratamientos
T0	Testigo (sin radiación)
T1	2 s de radiación
T2	4 s de radiación
T3	6 s de radiación
T4	8 s de radiación
T5	10 s de radiación

### 3.5 Determinación de humedad de las semillas irradiadas.

Para poder determinar el efecto de cada tratamiento de radiación, las semillas de *A. salmiana* fueron pesadas antes y después de la aplicación del tratamiento por microondas en una balanza

analítica (Marca Ohaus<sup>®</sup>, Modelo Pioneer<sup>™</sup>, New York, EE. UU.), con el fin de evaluar la pérdida de humedad. Para calcular esta pérdida, se utilizó la siguiente fórmula:  $\%h = \frac{Mh - Ms}{Mh} * 100$

*Donde:*

Masa húmeda (Mh): Peso de las semillas antes de aplicar el tratamiento con microondas

Masa seca (Ms): Peso de las semillas después de aplicar el tratamiento con microondas

### **3.6 Pruebas de viabilidad y germinación de las semillas irradiadas.**

Para la germinación de las semillas irradiadas, se utilizaron cajas Petri estériles, en las cuales se colocaron 11 semillas por caja, esto debido a cuestiones de espacio en las cajas (6 cajas Petri por tratamiento), en total 66 semillas por tratamiento. Se mantuvo la humedad con toallas de papel (Servitoalla) colocadas en la parte inferior de cada caja de Petri e impregnadas de agua destilada estéril. Sobre la superficie humedecida, se colocaron las semillas, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad. El monitoreo de su germinación se realizó cada 24 h, durante un periodo de 15 d. Cada caja de Petri con semillas fue identificada en base al tratamiento correspondiente.

Cuando el coleóptilo de las plántulas alcanzó una longitud aproximada de 10 cm y la raíz principal ya se encontraba desarrollada (después de 15 d de germinación), las plántulas se trasladaron a bolsas de plástico de 30 x 11 cm, rellenas con una mezcla de tierra negra de campo, tepetate y arena de piedra caliza, a proporciones iguales, para dar el seguimiento de su crecimiento en condiciones de invernadero.

#### **3.6.1 Seguimiento y evaluación de las semillas irradiadas germinadas.**

Las semillas irradiadas y germinadas se mantuvieron en condiciones de invernadero para su crecimiento durante un periodo de 12 meses, se mantuvieron en observación y se realizó un registro sobre el crecimiento, tamaño y desarrollo del número de hojas.

### **3.7 Obtención de extracto etéreo (grasa total) de las semillas.**

Para la extracción de grasa, se utilizó la técnica de arrastre de vapor a través de solventes volátiles. Se utilizaron los dos tipos de semillas de *A. salmiana* (maguey chalqueño y maguey

manso) evaluadas en este estudio. Para la extracción, se utilizaron 10 g de semilla de ambas variedades de *A. salmiana*, las muestras se molieron utilizando un molino de café (Marca Hamilton Beach, Modelo 80350RV, EE. UU.), la harina obtenida se colocó dentro de un cartucho de celulosa (Watman 22mm de diámetro interno x 65mm de altura). Posteriormente se montó un equipo Soxhlet (Figura 7a) dentro del cual se colocó el cartucho de celulosa con la muestra. Para el equipo Soxhlet se utilizó como solvente éter etílico (temperatura de ebullición 34°C). Una vez montado el sistema, se contaron 15 ciclos de contacto del solvente con la muestra. Terminados los 15 ciclos, se desmontó el equipo Soxhlet dejando solamente la mantilla y el matraz con el solvente que contiene las grasas extraídas para en seguida montar un sistema de destilación (Figura 7b) para separar la grasa total extraída del solvente. Subsecuentemente, la muestra de semilla del cartucho de celulosa ya desengrasada se guardó y etiquetó para su posterior uso. Una vez que las grasas extraídas fueron separadas del solvente, se procedió a pesar el extracto etéreo obtenido.

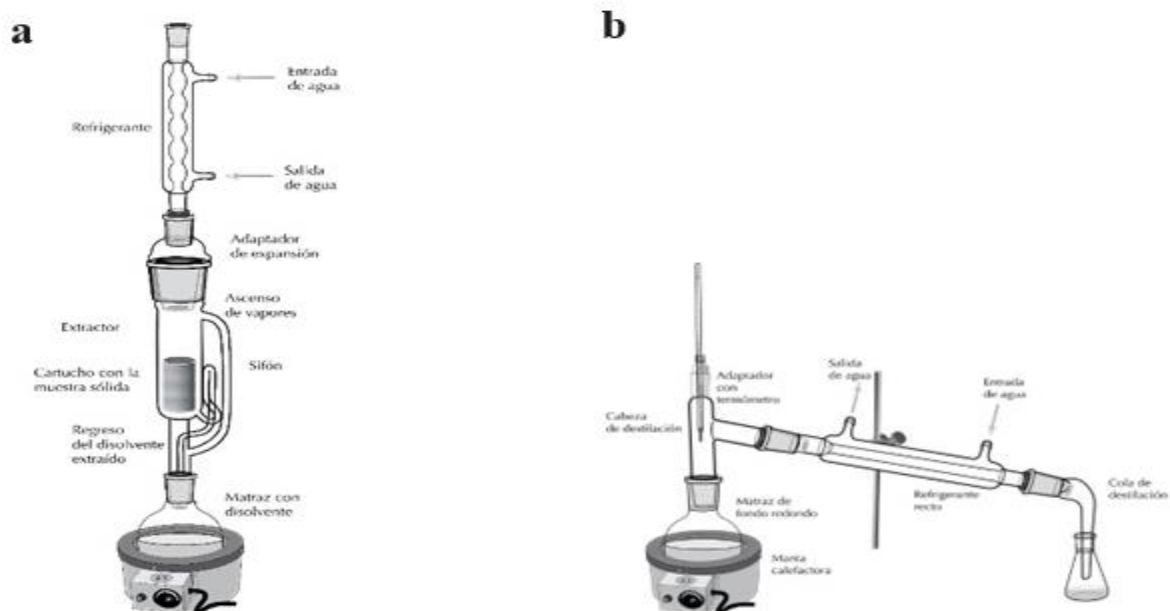


Figura 7. Ejemplificación de un equipo Soxhlet (a) y de un equipo de destilación (b).

### **3.8 Extracción y cuantificación de proteína total de las semillas desengrasadas y sin desengrasar.**

Se pesó 1 g de semilla de *A. salmiana* en una balanza analítica (Marca Ohaus®, Modelo Pioneer™ PA114, New York, EE. UU). La muestra de semilla se molió utilizando un molino de café (Marca Hamilton Beach, Modelo 80350RV, EE. UU.). La harina de las semillas desengrasadas y sin desengrasar se colocó por separado en un matraz Erlenmeyer con rosca y se agregaron 100 mL de agua destilada y se mantuvo en agitación en una parrilla (Marca Thermo Scientific, Modelo SP88854100, EE. UU.) durante una hora. La mezcla obtenida se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm, 4°C utilizando tubos Falcon de 50 mL. El sobrenadante de los tubos se recolectó y se etiquetó para su posterior uso. A cada tubo de la muestra del tratamiento (T0, T1, T2, T3, T4, T5) se le agregaron 100 µl del sobrenadante correspondiente y 1 mL de reactivo Bradford y se mezcló con ayuda del equipo agitador Vortex (APENDICE A), todo esto se realizó por triplicado. Finalmente, cada una de las muestras contenidas en los tubos se leyó en el espectrofotómetro a un rango de lectura de 595 nm y se registraron los datos de las lecturas obtenidas.

#### **3.8.1 Extracción fraccionaria de proteínas de *A. salmiana*.**

Para la extracción de proteínas de las semillas de *A. salmiana*, (maguey chalqueño) se utilizó la técnica descrita por (González-Cruz *et al.*, 2014) se pesó 1 g de semilla y se procedió a molerla utilizando un molino de café (Marca Hamilton Beach, Modelo 80350RV, EE. UU.), este procedimiento se repitió cuatro veces aplicando a las semillas los tratamientos de 0, 6, 8, y 10 s de microondas. Se decidió solo trabajar con las semillas de estos tratamientos debido a que fueron las que presentaron mejor porcentaje de germinación.

##### **3.8.1.1 Extracción de albúminas.**

La harina de las semillas se extrajo con agua destilada (0.1 g/mL) mediante la agitación magnética por 1 h a 4° C y luego se centrifugo a 5000 rpm durante 30 min a 4° C. El sobrenadante se separó y liofilizó. (Marca Labconco, Modelo 700401030, a condiciones 2.0mBar, -50°C, por 120h).

### **3.8.1.2 Extracción de globulinas.**

El residuo (pellet) de la extracción de albuminas se colocó en agitación magnética durante 1 h con NaCl (10g/100g) a 4° C y se centrifugo a 5000 rpm durante 30 min a 4° C. El sobrenadante se dializo contra agua destilada durante 5 d, cambiando el agua de diálisis todos los días. Por último, se liofilizó.

### **3.8.1.3 Extracción de prolaminas.**

El residuo resultante de la extracción de globulinas se colocó en agitación magnética durante 1 h a 4° C con 2-propanol acuoso al 70% y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se dializo con ácido acético (1mL/100mL) durante 5 d, con cambios diarios de solución, posteriormente se liofilizó.

### **3.8.1.4 Extracción de glutelinas.**

El residuo resultante de la extracción de prolaminas se puso bajo agitación magnética durante 1 h a 4° C con NaOH (pH 12) y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min a 4° C. El sobrenadante se dializó con ácido acético (1mL/100mL) durante 5 d, con cambios diarios de solución, y finalmente se liofilizó.

## **3.8.2 Electroforesis.**

### **3.8.2.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).**

Los liofilizados obtenidos de la extracción de albúminas, globulinas, prolaminas, glutelinas se les agregó 0.1 mL de buffer de muestra en tubos Eppendorf, se aseguró la tapa de los tubos y se sometieron las muestras a una temperatura de 70° C (Termoblock Marca Thermo Scientific, Modelo BAS501615, EE. UU.) durante 5 min. Controlando la temperatura con un termómetro de mercurio. Una vez finalizado el procedimiento, se retiraron los tubos del termoblock y se centrifugaron por un minuto a 13000 rpm y se mantuvieron en una gradilla con hielo hasta el proceso de electroforesis. Se sumergió el sistema de electrodos que contenía los geles polimerizados en la cámara con buffer de corrido y se aseguró que los pocillos del gel estuvieran totalmente cubiertos por el buffer. Las muestras se depositaron en los pocillos y una vez finalizada la colocación de las muestras en cada pocito del gel, se cubrió la cámara

con la tapa y se conectaron los cables de los electrodos en la fuente de poder a 25mA durante 20 h. Una vez terminado, los geles de tiñeron con colorante azul de Comassie.

### **3.9 Cuantificación de azúcares reductores (DNS).**

Para la determinación de azúcares reductores por el método DNS de Miller *et al* (1959) se preparó el reactivo DNS (disolviendo 0,8 g de NaOH en agua destilada, luego se adicionaron 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0.5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico). Esta mezcla se aforó a 50 mL con agua destilada y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C. Para obtener la curva estándar se prepararon soluciones de 200-1000 mg/L, se utilizó glucosa como estándar. A estas soluciones se les aplica el método DNS y se leyó la absorbancia de cada una de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (APÉNDICE C).

De las muestras de semillas, se pesó 1 g de semilla para cada tratamiento, dichas muestras se sometieron a diferentes tiempos en microondas (0, 6, 8 y 10 s), y posteriormente se molieron. A las harinas de las muestras se les adicionó 5 mL de agua destilada, se mezclaron con el equipo vortex y se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm y se obtuvo el sobrenadante. Se colocó 1 mL de muestra de cada tratamiento por triplicado en un tubo Falcón de 25 mL y se agregó a cada tubo 1 mL del reactivo DNS, los tubos se colocarán a ebullición por 5 min en baño María e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Posteriormente se reconstituyeron las muestras con 10 mL de agua destilada, se agitaron, se dejaron en reposo por 15 min, y se determinó su absorbancia a 540 nm a temperatura ambiente. El blanco se trató de la misma forma, pero se agregó 1 mL de agua destilada en sustitución de la muestra.

### **3.10 Observación de la microestructura de las semillas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).**

Para el análisis microestructural de las semillas de *A. salmiana* (maguey manso y chalqueño, sometidas a los diferentes tratamientos, las muestras se montaron en cintas de carbón de doble cara, para posteriormente ser recubiertas con una capa de oro durante 500 s, sobre un soporte de revestimiento de carbono (IB-12510CCH). Después, se tomaron las micrográficas con un microscopio electrónico (MEB ; JEOL, Modelo IT300, Boston, MA, EE. UU.) ubicado en las instalaciones de en la Escuela Superior de Apan-UAEH.

### **3.11 Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)**

La espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS, también abreviada EDX o XEDS) permitió la caracterización química/análisis elemental del material evaluado. Utilizando también el microscopio electrónico de barrido para este propósito. Se realizó un análisis estructural elemental (EDS) de algunas zonas de las semillas de *A. salmiana* tratadas con microondas para verificar los cambios de composición elemental porcentual.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Tamaño de las semillas de *A. salmiana*.

En la medición del ancho y largo de las semillas de *A. salmiana* (maguey chalqueño y manso) se encontró en promedio de  $8.5 \pm 0.05$  mm de largo y  $6.0 \pm 0.08$  de ancho, y  $7.0 \pm 0.04$  de largo a  $4.0 \pm 0.05$  de ancho, respectivamente. Al respecto, Vázquez-Díaz *et al* (2011) señalaron que en semillas de maguey blanco, chino y liso (todos pertenecientes a la especie *A. salmiana*), las medidas promedio fueron de  $7.1 \pm 0.09$  mm de largo a  $5.4 \pm 0.11$  mm de ancho,  $8.4 \pm 0.09$  mm de largo a  $6.5 \pm 0.10$  mm de ancho y  $8.3 \pm 0.08$  mm de largo a  $5.6 \pm 0.08$  mm de ancho, respectivamente. Por otra parte, en otro estudio se señala que las semillas *A. salmiana* miden en promedio entre 7.0 a 8.0 mm de largo por 5.0 a 6.0 mm de ancho en promedio CONABIO, (2018). En la Tabla 6, se muestra un ejemplo de las medidas obtenidas de las semillas y en la Figura 8 se muestran algunas de las características morfológicas que se evaluaron en las semillas de las muestras de semillas de plantas de *A. salmiana* estudiadas (maguey chalqueño y manso).

Tabla 6. Características físicas evaluadas de las semillas de *A. salmiana*.

Tipo	Especie y variedad	Largo y ancho (mm)	
		Semilla (1)	Germen (2)
Tipo 1	<i>A. salmiana</i> / maguey chalqueño	Largo: 8 Ancho: 6	Largo: 5 Ancho: 1
Tipo 2	<i>A. salmiana</i> / maguey manso	Largo: 7 Ancho: 4	Largo: 5 Ancho: 1



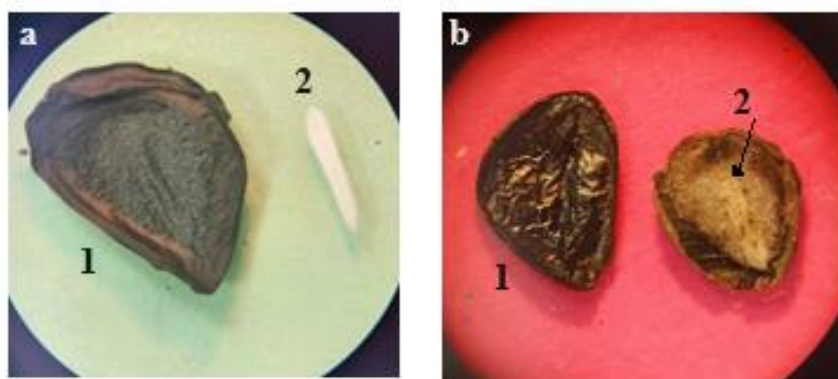


Figura 8. Características morfológicas de la semilla y embrión de *A. salmiana*. a) maguey chalqueño y b) maguey manso.

#### 4.2 Determinación de la humedad de las semillas.

El porcentaje de humedad obtenido de las semillas de *A. salmiana* fue de 10.4% para el maguey manso y de 10.1% para el maguey chalqueño. Los valores mayores a los registrados en este trabajo fueron superiores a los valores reportados por Peña-Valdivia *et al*, (2006) con una humedad de 7% en semillas de *A. salmiana Otto ex Salm-Dyck* y del 5% para semillas de *Agave potatorum* (Gutierrez-Hernandez *et al.*, 2020).

#### 4.3 Peso de las semillas tratadas con microondas.

Las muestras de 66 semillas de cada tratamiento se pesaron antes y después de la aplicación de las diferentes dosis con microondas (Tabla 7).

Tabla 7 Pesos de las semillas de *A. salmiana* antes y después de la aplicación de microondas.

Clave	Peso ((g) ± DS) Antes	Peso ((g) ± DS) Después
T0	0.280 ± 0.01	0.280 ± 0.01
T1	0.308 ± 0.01	0.308 ± 0.01
T2	0.304 ± 0.01	0.303 ± 0.01
T3	0.305 ± 0.02	0.304 ± 0.02
T4	0.299 ± 0.01	0.297 ± 0.01
T5	0.297 ± 0.009	0.295 ± 0.009

#### 4.3.1 Determinación de la humedad en las semillas después del tratamiento.

Se determinó la pérdida de humedad de las semillas respecto a los diferentes tratamientos con microondas que recibieron (Tabla 8).

Tabla 8. Pérdida porcentual de humedad de las semillas irradiadas.

	Tratamientos					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Porcentaje (%)	0	0.12	0.32	0.32	0.66	0.67

#### 4.4 Germinación *in vitro*.

El monitoreo de la germinación de las semillas en las cajas de Petri de plástico, se realizó cada 24 h, durante 15 d. En la Figura 9, se muestra que el mayor porcentaje de semillas germinadas que inicialmente fueron las semillas del T3. La razón principal por la cual se cree que la germinación de las semillas se acelera es debido a que la radiación con microondas induce la alteración de la conductividad eléctrica de las membranas celulares del embrión, provocando un cambio en la concentración de iones a ambos lados de la pared y por ende genera cambios en la presión osmótica, lo que le permite a la semilla absorber el agua más rápido y por lo tanto germinar de manera más rápida.

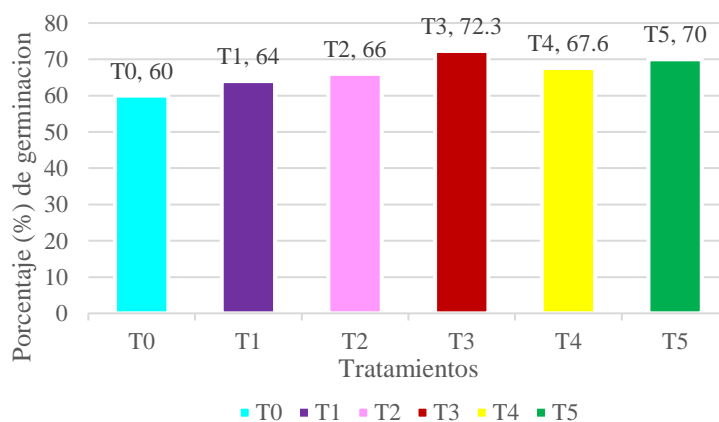


Figura 9. Porcentaje de germinación *in vitro* de las semillas de *A. salmiana* (maguey chalqueño) a 20 días.

#### 4.4.1 Seguimiento y evaluación *in vitro* de las semillas germinadas e irradiadas.

El crecimiento de las semillas se monitoreo cada 24 h, durante un lapso de 15 d, tiempo en que el coleóptilo de la planta alcanzó una longitud aproximada de 10 cm y la raíz ya se

encontraba desarrollada (Figura 10). Posteriormente, las plántulas se trasplantaron a bolsas con tierra para el seguimiento de su crecimiento en condiciones de invernadero.

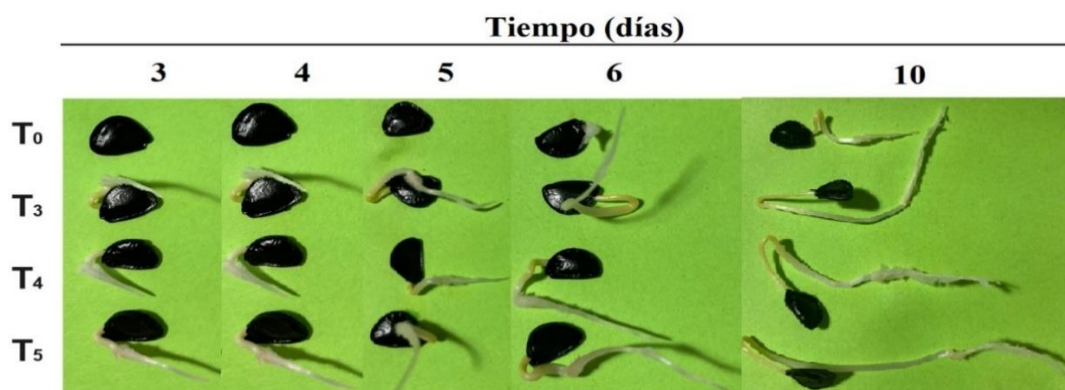


Figura 10. Proceso de germinación de semillas de *A. salmiana* (maguey chalqueño) en condiciones *in vitro*.

#### 4.4.2 Seguimiento y evaluación *in vivo* de las semillas germinadas e irradiadas.

A las semillas de *A. salmiana*/ maguey chalqueño (ocupadas para la germinación *in vitro* e *in vivo*) se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 12 meses para observar la evolución de su crecimiento y desarrollo. Se tomó un ejemplar de cada tratamiento para ilustrar el crecimiento que presentaron a lo largo de los 12 meses que duró el experimento en condiciones de invernadero (Figura 11).

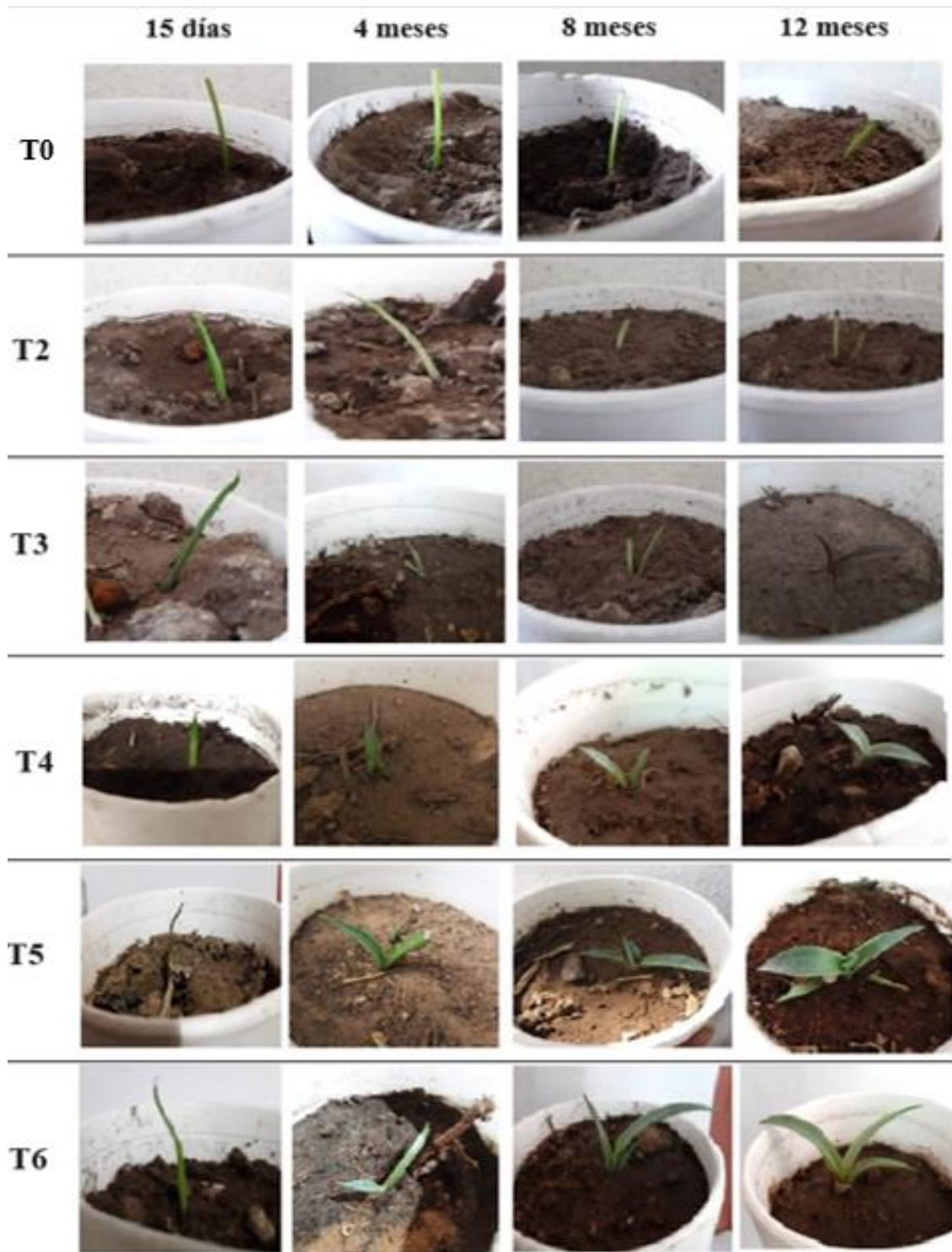


Figura 11. Efecto de los tratamientos de irradiación sobre el desarrollo de la plántula de *A. salmiana* (maguey chalqueño).

## 4.5 Composición bioquímica de las semillas.

### 4.5.1 Obtención de extracto etéreo (grasa total) de las semillas.

Para la extracción de extracto etéreo de las semillas de maguey, se utilizó la técnica de arrastre a través de solventes volátiles. Se utilizaron los dos tipos de semillas de *A. salmiana* (maguey chalqueño y manso). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9. Observándose el mayor porcentaje de grasas totales extraídas en las semillas de *A. salmiana*/ maguey chalqueño. El tiempo aproximado por cada ciclo fue de entre 35-40 min.

Tabla 9. Peso del extracto etéreo obtenido de las semillas de *A. salmiana*.

Especie/variedad	Semillas (g)	No. de ciclos	Extracto etéreo (%)
<i>A. salmiana</i> /chalqueño	10	15	14.9
<i>A. salmiana</i> /manso	10	15	12.4

Una vez obtenido el extracto etéreo de las dos muestras de semillas de *A. salmiana* se pudo constatar que la coloración de las grasas obtenidas de las semillas del maguey manso y del maguey chalqueño mostraron características diferentes (Figura 12). El extracto etéreo total extraído de la semilla de maguey chalqueño fue de un color verde claro y emanaba un olor muy agradable similar a la planta de anís (*Pimpinella anisum*), en cambio las grasas extraídas del maguey manso fueron de un color naranja y emanaba un olor desagradable a rancio.

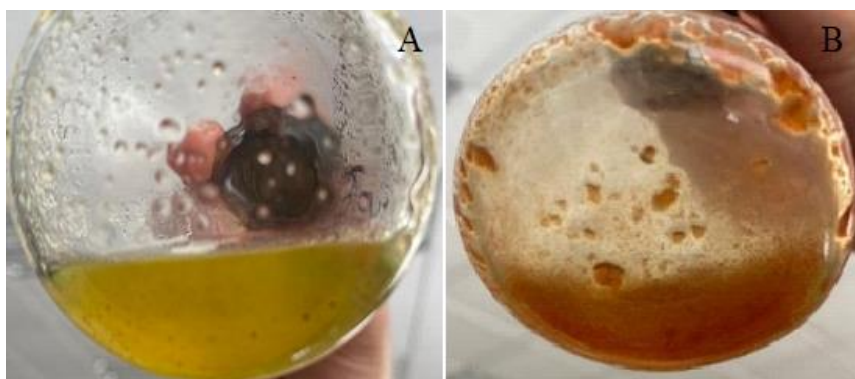


Figura 12. Extracto etéreo obtenido de *A. salmiana*. A) Maguey chalqueño y B) Maguey manso.

## 4.6 Extracción y purificación de proteínas.

### 4.6.1 Cuantificación de proteína total (Método Bradford).

Para la cuantificación total de las proteínas se empleó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se extrajo el extracto hidrosoluble de las semillas de *A. salmiana* (Chalqueño y Manso). Los cambios de estas proteínas (Figura 13 y 14) se confirmaron en los tratamientos (T1, T2, T3, T4 y T5) en comparación con el testigo (T0) haciendo la comparación de las lecturas de OD obtenidas del espectrofotómetro de luz visible e interpolados con los datos de OD de la curva control de BSA realizada (APENDICE A).

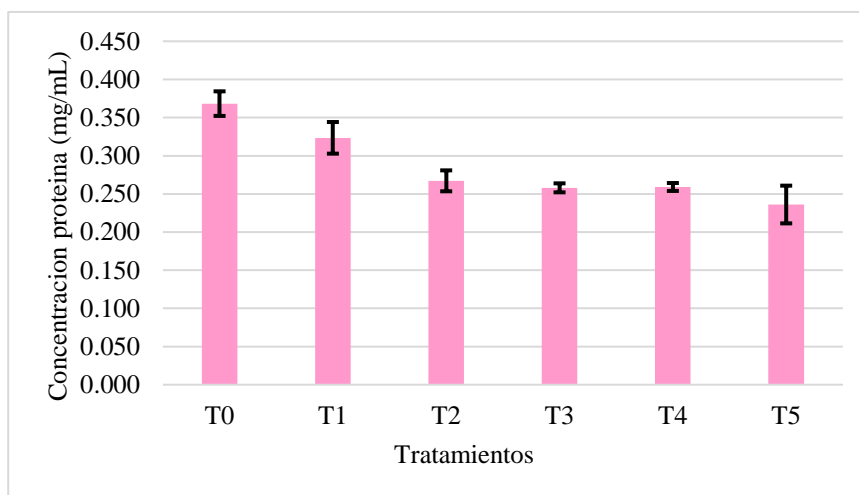


Figura 13. Concentración proteína total en las semillas de *A. salmiana*/ Maguey chalqueño con diferentes tratamientos.

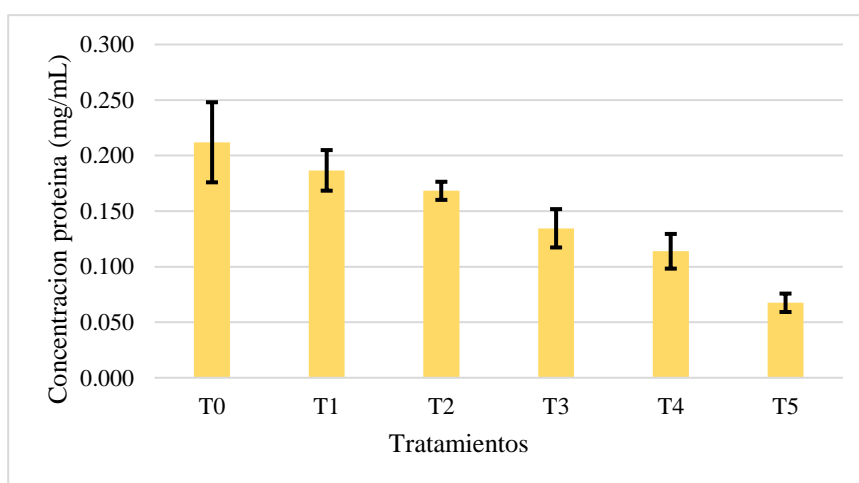


Figura 14. Concentración proteína total en las semillas de *A. salmiana*/ Maguey manso con diferentes tratamientos.

Para ver la interferencia del contenido de grasa, se realizó la cuantificación total de la proteína en muestras de semillas desengrasadas (Figura 15) y se compararon con las semillas sin desengrasar. Después de haber realizado diferentes pruebas preliminares con las semillas de maguey chalqueño y maguey manso, se decidió sólo trabajar con las semillas de maguey chalqueño por la facilidad de conseguir la semilla.

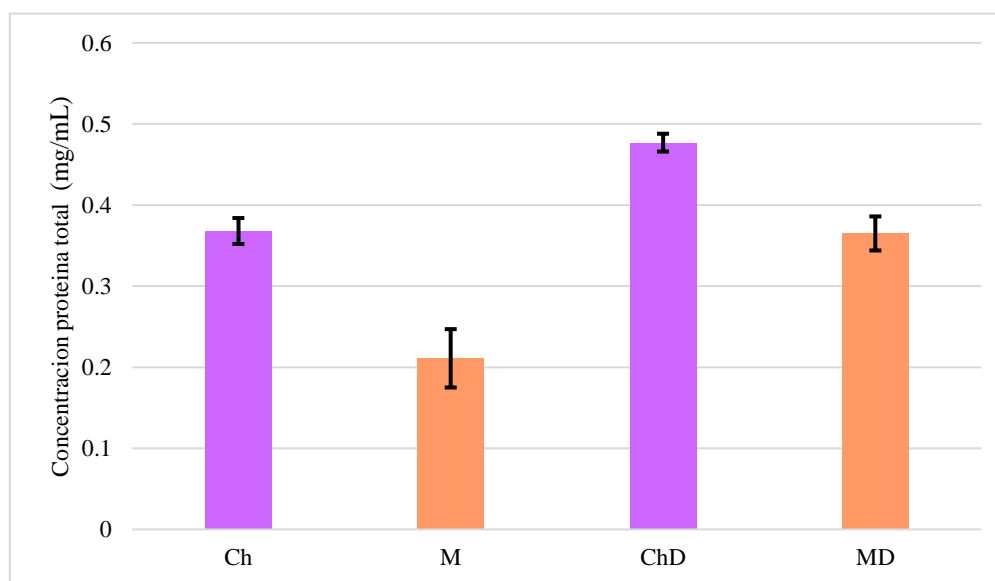


Figura 15. Proteína total en las semillas de *A. salmiana*/ maguey chalqueño y maguey manso desengrasadas y sin desengrasar. **Ch**: Chalqueño sin desengrasar, **M**: Manso sin desengrasar, **ChD**: Chalqueño desengrasada, **MD**: Manso desengrasada.

#### 4.6.2 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

En la Figura 16 y Tabla 10, se puede observar el patrón electroforético de las fracciones proteicas obtenidas. Los pesos moleculares se determinaron con ayuda de la curva realizada con los marcadores moleculares conocidos (APENDICE E).

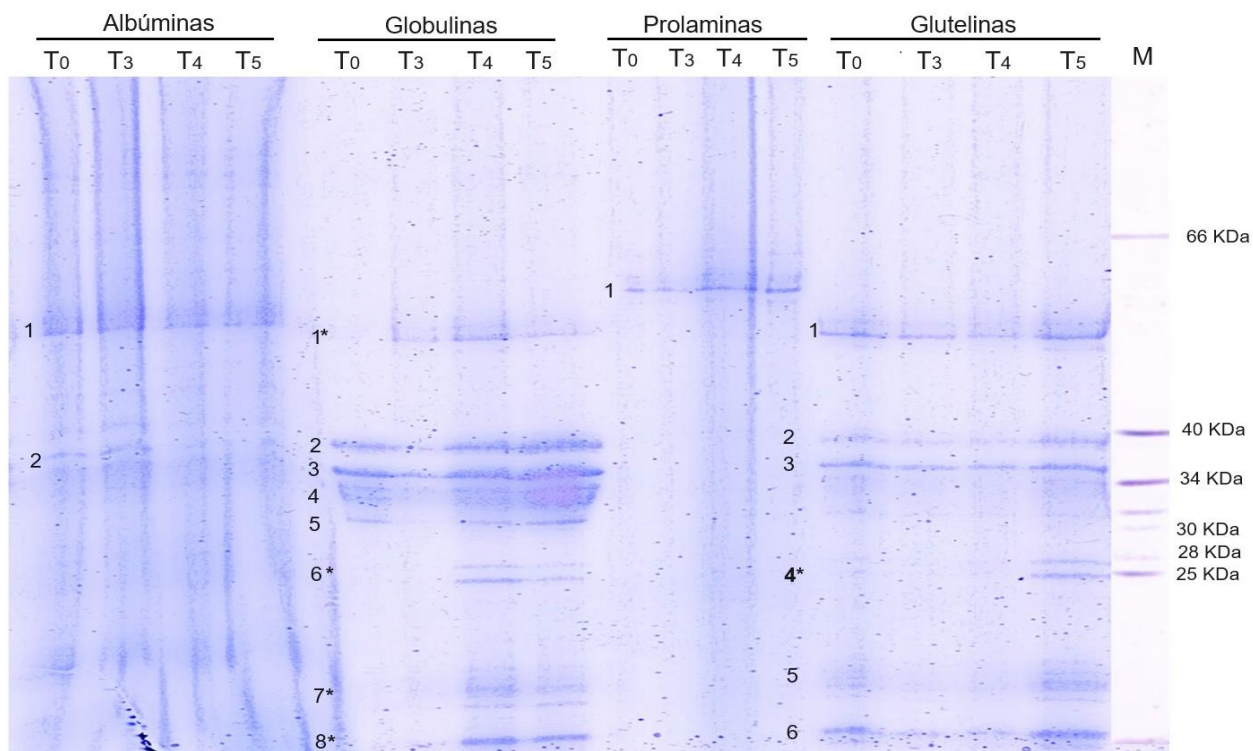


Figura 16. Patrón electroforético de las fracciones proteicas de la semilla de *A. salmiana*/ Maguey chalqueño. *M*, marcador de peso molecular.

Tabla 10. Registro de pesos moleculares (kDa) de las diferentes fracciones proteicas.

No. de banda	Albuminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
1	47.53	46.76	50.60	45.99
2	46.76	37.93		37.93
3		36.01		36.01
4		34.00		* 25 y 28
5		32.17		14.89
6		* 28.00		12.97
7		* 25.00		
8		* 14.89		

\*: Bandas presentes en las fracciones proteicas de las semillas irradiadas que no están presentes en las semillas del T0.

En los resultados se observan cambios en las fracciones proteicas de las globulinas y las glutelinas las cuales son proteínas de reserva con el tratamiento T4 y T5. Muñoz-Llandes *et al.* (2021) explica que durante el proceso de germinación se lleva a cabo una proteólisis catalizada que promueve la degradación de las proteínas de almacenamiento. Lo que genera que a partir de dichas proteínas se generen fracciones peptídicas de menor peso molecular.



#### 4.7 Contenido de azúcares reductores (DNS).

La determinación de azúcares reductores por el método DNS de las diferentes muestras de semilla mostró un decrecimiento en la concentración (mg/mL) de estos azúcares en las muestras de semillas irradiadas de maguey chalqueño (Figura 17).

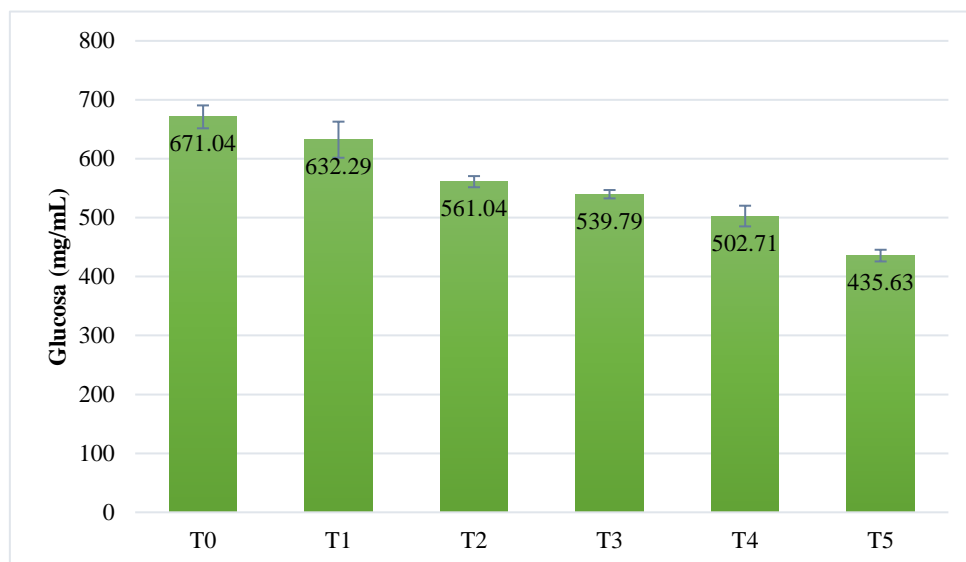


Figura 17. Concentración de azúcares reductores (mg/mL) de las muestras de las semillas de *A. salmiana*/ Maguey chalqueño con diferentes tratamientos.

Megat-Rusydi *et al.* (2011) informaron que durante la germinación, los carbohidratos se utilizan como fuente de energía para el desarrollo embrionario, lo cual podría explicar los cambios observados en la concentración de glucosa de semillas irradiadas para los diferentes tratamientos evaluados. Por otra parte, Muñoz-Llandes *et al.* (2021) mencionan que cuando las enzimas hidrolíticas se activan debido al proceso de germinación se inicia la desintegración de macromoléculas principalmente carbohidratos y proteínas.

#### 4.8 Determinación de la microestructura en MEB de las semillas irradiadas.

En las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de las semillas tratadas con microondas (T1 a T5), no se observó que sufrieran algún tipo de daño estructural por la exposición a las microondas (Figura 18).

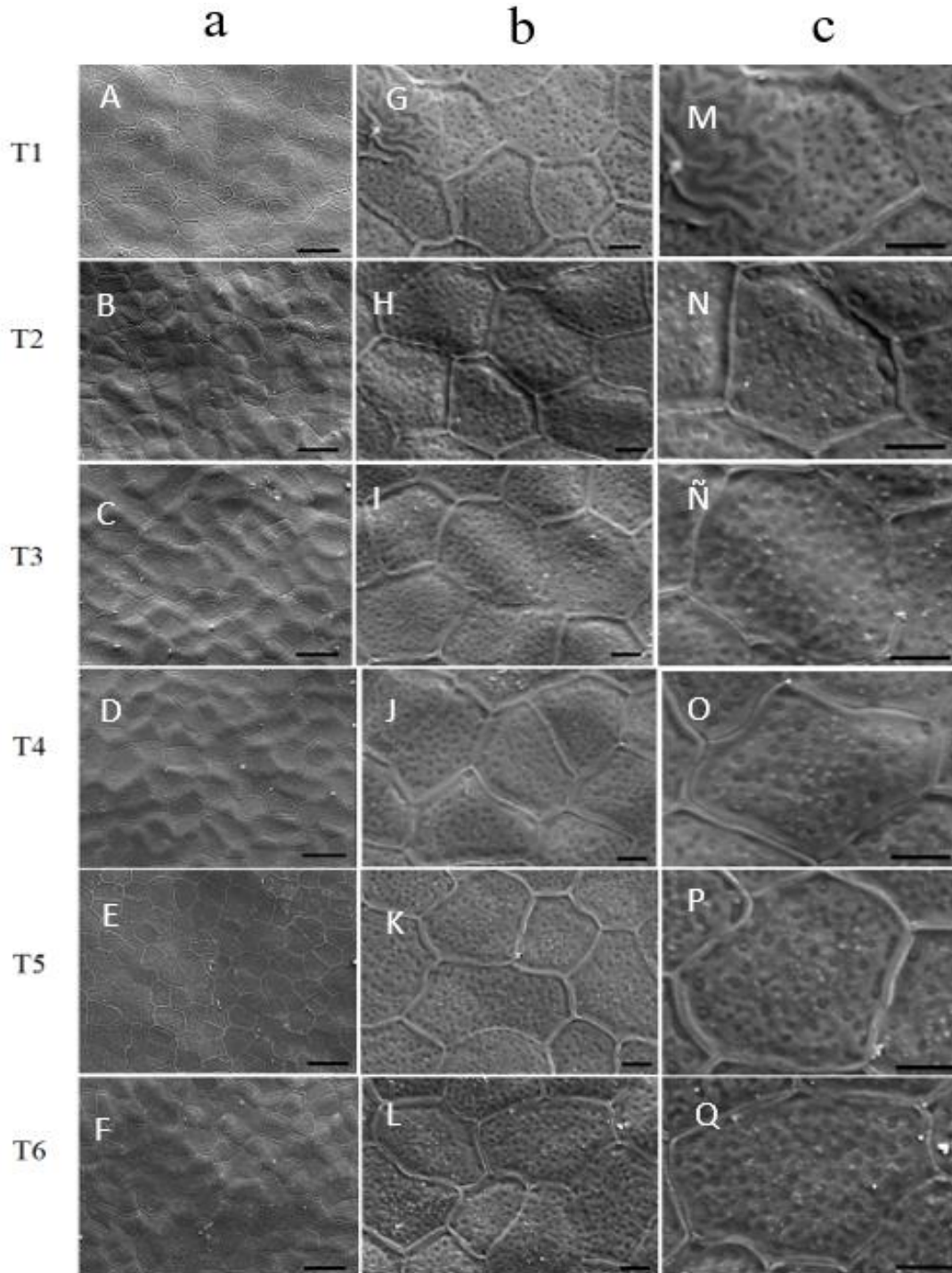


Figura 18. Micrografías MEB a diferentes aumentos (a) 350, (b) 1300, (c) 2500 de semillas de *A. salmiana*/Maguey chalqueño irradiadas. Barras de escala: A-F= 50  $\mu$ m, G-Q= 10  $\mu$ m.

#### 4.9 Análisis Estructural Elemental (EDS).

Utilizando el microscopio electrónico de barrido, se realizó un análisis estructural elemental de algunas zonas de las semillas de maguey chalqueño, las cuales proporcionaron un espectro de composición elemental porcentual (Figura 19 y 20).

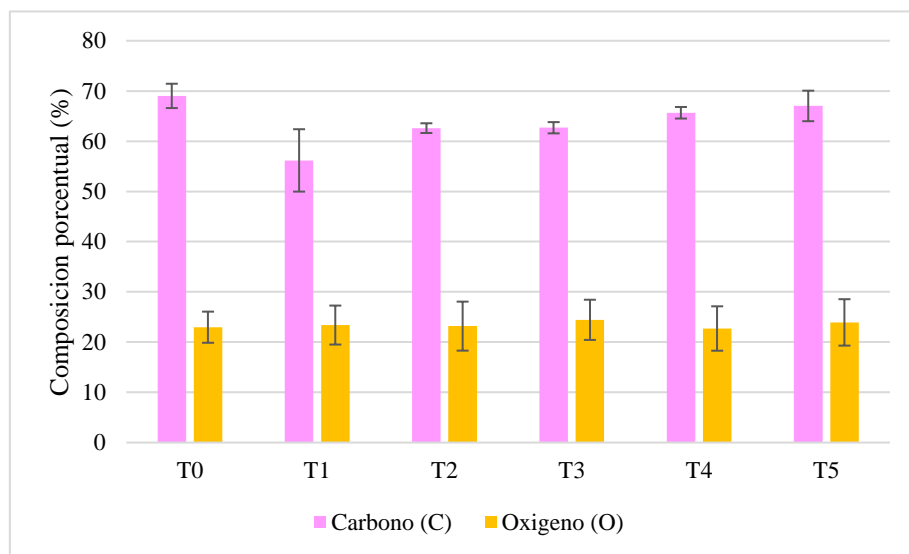


Figura 19. Composición elemental (%) de Carbono (C) y Oxígeno (O) en las semillas de *A. salmiana*/ Maguey chalqueño con los diferentes tratamientos.

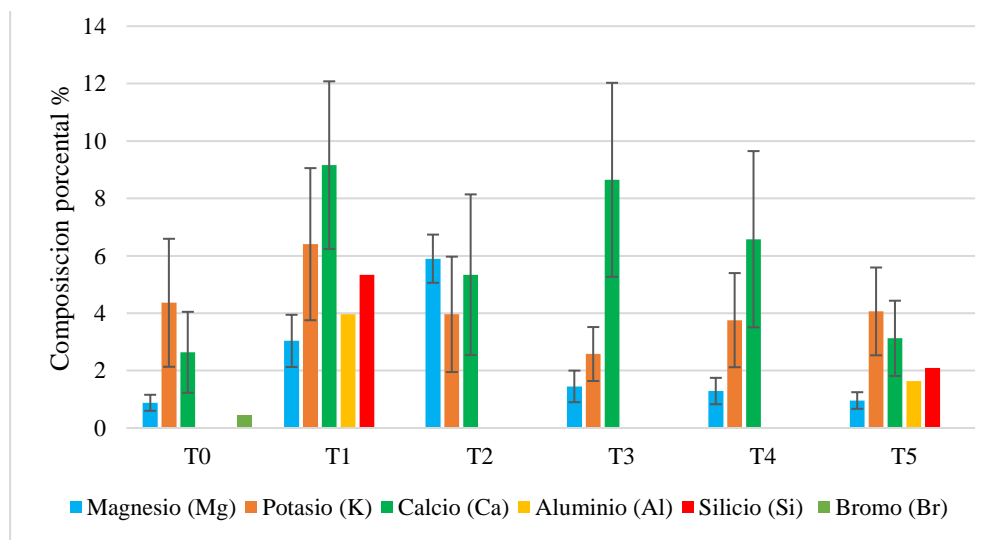


Figura 20. Composición elemental (%) en las semillas de *A. salmiana*/ Maguey chalqueño con los diferentes tratamientos

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

Los tratamientos de irradiación (T1, T2, T3, T4 Y T5) no alteraron microscópicamente la estructura de la testa, y el contenido porcentual (%) de extracto etéreo (grasa total) de las 2 muestras de semillas de *A. salmiana* (maguey manso y chalqueño) fue de 12.4 y 14.9 % respectivamente. Durante el desarrollo *in vitro* de las semillas de *A. salmiana* (maguey chalqueño) el tratamiento que mostró mejor tasa de germinación inicialmente fue el T3, sin embargo, posteriormente en el desarrollo *in vivo* las plántulas que presentaron mejor tamaño y desarrollo a los 12 meses fue el T5. En la determinación de concentración de proteína total y azúcares reductores (glucosa) los tratamientos de irradiación presentaron una disminución.

## REFERENCIAS

- Alcantara, C.J.S., Acero, G. J., Alcantara C.J.D., Sánchez M.R.M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*. 17(32): 109-129.
- Álvarez , A., Ramirez , R., Chavéz, L., Camejo S., Y., Licea C., L., Porras, E., & García, B. (2011). Efecto del tratamiento de semillas con láser de baja potencia, sobre el crecimiento y rendimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). *Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario ( AIDA )*.107(4):, 290-299.
- Andrade, J. L., De la Barrera, E., Reyes G., C., Ricalde , M. F., Vargas S., G., & Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiologica ambiental y productividad . *Boletin de la Sociedad Botanica de Mexico.*, 81: 37-50.
- Angeles , V. B. V., Mercado, F., Y., Garcia, M., A., Rodríguez G., B., Anducho R., M. A., & Cervantes, A. J. (2017). Embriogénesis somática: una alternativa para el cultivo masivo del maguey pulquero *Agave salmiana var. salmiana*. *Ciencias Multidisciplinarias Proceedings T-III, Universidad Politecnica de Pachuca*, 37-50.
- Armesto A., A., Angarita., W., & Lobo, J. R. (2015). Efectos de la radiación electromagnética sobre la germinación del maíz. *Tecnura* , 19 (45): 65-73.doi:10.14483/udistrial.jour.tecnura.2015.3.a05.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem*, 72: 248-254.
- Carrillo B.N. (2016). Influencia del nitrato, acido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) en la transición dormición-germinacion de semillas de *Sisymbrium officinale* (L.) Scop, sometidas a “post-maduración”. Tesis doctoral. *Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España*.
- Casasola, P. M. (2009). *Vida y obra de granos y semillas*. 2da edición. Fondo de cultura economica de españa, México D.F.
- Castillo, Q. D., Bautista, A. A., Ávila, F. D. Y., Sáenz, R. J. T., & Castillo. R. F. (2018). Tratamientos químicos y biológicos para estimular la germinación en semillas de *Nolina cespitifera* Trel. *Polibotánica.*, 45: 147-156.
- Castroviejo-Fernández, M.P. (2020). Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). UNIVERSIDAD DE BURGOS. Consultado [14/02/2024]. Obtenido de: <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/microscopia/microscopia-electronica-de-barrido-meb>

- Chapín, M. C. (2016). *Universidad de Guayaquil*. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18259/1/BCIEQ-MBC-147%20M%c3%a1rquez%20Chap%c3%adn%20Milton%20Cruz.pdf>
- Chel, G. L. A., Corzo R., L., & Betancur A., D. A., (2003). Estructura y propiedades funcionales de las proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán.*, 227: 34-43.
- CONABIO. (2018). Informe final\* del proyecto NE012 Actualización de la información de las especies y subespecies de magueyes de Oaxaca, con énfasis en las especies mezcaleras. Consultado [14/02/2024]. En línea: [http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/NE012\\_Anexo\\_Fichas\\_agave.pdf](http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/NE012_Anexo_Fichas_agave.pdf)
- CONABIO. (2021). Magueyes. *Biodiversidad Mexicana*. Obtenido de <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/magueyes>.
- CONVITE. (2019). Conoce más sobre los Agaves. Consultado [14/02/2024]. En línea: <https://convitemezcal.com/los-agaves/>.
- Correa N., Y. M., Buriticá S., L. M., Rivera G., J. D., Penagos G., J. P., & Torres O., J. I. (2017). Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L). *Revista Facultad de Ciencias Básicas.*, 60-64. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2756>.
- Courtis A.C. (2013). Germinación de semillas. Cátedra de Fisiología Vegetal. FaCENA Pp 1-23. En línea: <https://exa.unne.ar/24isiolog/24isiología.vegetal/GuiadeestudioGerminacion.pdf>.
- Cruz V. S. T., Ruiz P. L. del García M. E., Sandoval V. M., & Cruz H. N. (2020). Crecimiento y tasa de intercambio de CO<sub>2</sub> de maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) obtenido por semilla. *Agrociencia*, 45(7): 911-926.
- Cuadra, de la C. (1992). Germinación, latencia y dormición de las semillas. Dormición en las avenas locas. Hojas divulgadoras. *Ministerio de agricultura, pesca y alimentación*. Núm 3/92 HD. Madrid, España. Consultado [14/02/2023]. Obtenido de: [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1992\\_03.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1992_03.pdf).
- Cubero Salmerón, J., & Moreno, M. (1983). *Leguminosas de Grano*. 1ra edición. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Cuervo, P. J.A., Pérez, E.V.H., Pérez L. P. A., Morales, O.M.A., Arce, C.O. (2017). *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae): A Weevil Threatening the Production of *Agave* in Mexico. *Florida Entomologist* 102(1): 1-9 <https://doi.org/10.1653/024.102.0101>.
- Cundapi G. M. F. (2012). Caracterización de las proteínas de reserva de la semilla de *Agave atrovirens karw*. Tesis de Licenciatura. *Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez*.

Tuxtla Gutierrez , Chiapas, México. Obtenido de:  
<http://repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/3067/MDRPIBQ2012006.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Doran, J., Boland, D., Turnbull, J., & Gunn, B. (1983). Tratamientos para estimular la germinación de la semilla. Cap. 7. En manual sobre las semillas de acacias de zonas secas. *FAO*. Obtenido de: <https://www.fao.org/3/Q2190S/Q2190S08.htm>.8
- Finch, S. W.E. & Leubner, M. G. (2016). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3): 501-523.
- Flores, M. A., Castañeda, H. E., Sanchez, P. F. J., Romero, A. L., & Ruiz, L. J. (2009). Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el altiplano mexicano. *Somas Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible*, 6: 1-10.
- Frisby, M. A., Cordova Y. A., & Medina O. F. A. (2018). Diversificación en el uso del agave del bacanora: oportunidad económica para Sonoara. *UNAM*. Obtenido de: [http://ru.iiec.unam.mx/4278/1/4-Vol2\\_Parte2\\_Eje12\\_Cap1-039-Frisby-Cordova-Medina.pdf](http://ru.iiec.unam.mx/4278/1/4-Vol2_Parte2_Eje12_Cap1-039-Frisby-Cordova-Medina.pdf)
- Fukushima, D. (1991). Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Reviews International*. 7(3): 353-381. <https://doi.org/10.1080/87559129109540916>.
- García-Mendoza , A., & Galvan V, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México . *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56: 7-24. <https://doi.org/10.17129/botsoci.146>.
- García R. J. G., Cervantes O., F., Ramírez P. J. G., Aguirre M, C., Rodríguez P, G., Ochoa , F., & Mendoza E. M. (2017). Determinación de lisina, triptófano y proteína en germinados de maíz criollo y QPM. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 8(4): 877-890. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i4.14>.
- Geydan, T. D., & Melgarejo, L. M. (2005). Metabolismo ácido de las crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana*. 10(2): 3-13.
- Godínez A. , H., & Flores M. A. (1999). Germinación de semillas de 32 especies de plantas de la costa de Guerrero: su utilidad para la restauración ecológica. *POLIBOTÁNICA*. 11: 1-29.
- Gómez, R. E. P. (2020). Murciélagos polinizadores del noreste de México. *Biología y Sociedad*. 3(5): 35-4. <https://doi.org/10.29105/bys3.5-29>.
- González C. L., Teniente M. G., Montañez S. J. L., Vivar V. M., Filardo K. S., & Bernardino N. A. (2014). Agave Seeds: Physical and Chemical Characterization and Identification of Storage Proteins. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*. 2(6): 28-35.

- González, P.M.I. (2020). Métodos de análisis para la determinación de proteínas en cereales: amaranto y cebada. Tesis de Maestría. *Universidad de Santiago de Compostela*, España.
- González T. L., Téllez V. A., Sampedro, J. G., & Najera , H. (2007). LAS PROTEÍNAS EN LA NUTRICIÓN. *Revista Salud Publica y Nutrición*. 8(2): 1-7.
- Granich, C. I., Torres Garcia, I., Hernandez Lopez, J., Morales Moreno, P., Varela Alvarez , R., Ibañez Couoh, I., & Nava Xinol , H. (2018). Manual de manejo campesino de magueyes mezcaleros forestales. *Grupo de Estudios Ambientales, AC*. Obtenido de [https://static1.squarespace.com/static/5ca2d827aadd343de55a408b/t/60d37370f9d40424460951fa/1624470390347/Manual+maguey\\_2018.pdf](https://static1.squarespace.com/static/5ca2d827aadd343de55a408b/t/60d37370f9d40424460951fa/1624470390347/Manual+maguey_2018.pdf)
- Gutierrez H. G. F., Ortiz H. Y. D., Corzo R. L. J., & Aquino B. T. (2020). Composición química y germinación de semillas de Tobilá (*Agave potatorum*). *Interciencia*. 45 (5):223-228.
- Gutierrez, C. V. (2011). Indicadores nutricionales y bioquímicos del metabolismo del nitrógeno. *Universidad Autonoma de Baja California* . Consultado [13/11/2023] Obtenido de <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/1623/1/MXL107259.pdf>
- Iturbe , F., & Sandoval, J. (2011).Análisis de alimentos: Fundamentos y Técnicas. *UNAM*. Obtenido de [https://ada.educatic.unam.mx/pluginfile.php/522/mod\\_assign/intro/An%C3%A1lisis%20de%20alimentos%20fundamentos%20y%20t%C3%A9cnicas.pdf](https://ada.educatic.unam.mx/pluginfile.php/522/mod_assign/intro/An%C3%A1lisis%20de%20alimentos%20fundamentos%20y%20t%C3%A9cnicas.pdf).
- Jimenez P. P., Masson S., L., & Quitral R., V. (2013). Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista chilena de nutrición*. 40(2): 155-160. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000200010>.
- Katsube, T., Masahiro, O., Muruyama, N., Kurisaka, N., Ohtsuka, R., Utsumi, S., & Takaiwa, F. (1999). Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice. *Plant Physiology*. 120(4): 1063-1074. doi 10.1104/pp.120.4.1063. PMID: 10444090.
- Latham M.C. (2002). Cereales, raíces feculentas y otros alimentos con alto contenido de carbohidratos. Capítulo 26. En: *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Latham M. C. (Eds). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). En línea: <https://www.fao.org/3/W0073S/w0073s0u.htm>.
- López, K., Santa C.C., & Gutiérrez, A. (2016). Perfil de proteínas de las semillas de “sacha inchi” (*Plukenetia volubilis l.* y *Plukenetia huayllabambana bussmann*, Téllez & Glenn). *The Biologist (Lima)*. 14(1): 11-20. <https://doi.org/10.24039/rtb201614181>.



- Mantilla, A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. Cap. 7. En: Fundamentos de fisiología vegetal. *ResearchGate* 1-22.
- Marques, M. (2018). Método Lowy. *Know*. Consultado [5/12/2023]. Obtenido de <https://know.net/es/ciencias-tierra-vida/biologia-es/metodo-de-lowry/>.
- Megat, R. M. R., Noraliza, C. W., Azrina, A., & Zulkhairi, A. (2011). Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *International Food Research Journal*, 18(2): 688-696.
- Mendoza, G. E. J. & Mora, H. E. (2021). PCTI197. Germinación de semillas de *Agave angustifolia* en diferente madurez fisiológica de la inflorescencia. *Ciencia, Tecnología e Innovación*. 12: PCTI197.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428 <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Mohammad, M., Talei, D., & Mahzoon, M. (2018). Microwave radiation, seed germination and seedling growth responses in pepper (*Capsicum annum L.*). *Horticulture International Journal*. 2(6): 332-336.
- Mora L. J. L., Reyes A. J. A., Flores F. J. L., Peña V. C. B., & Aguirre R. J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género *Agave*. *Agrociencia*. 45(4): 465-477.
- Moreno H. A., Hernández M. R. & Ballesteros I. (2017). Secado industrial con energía de microondas. Cap. 5. En: Aplicaciones industriales del calentamiento con energía microondas. *Universidad Técnica de Cotopaxi*. Obtenido de: [https://www.researchgate.net/publication/316490866\\_Aplicaciones\\_industriales\\_del\\_calentamiento\\_con\\_energia\\_microondas](https://www.researchgate.net/publication/316490866_Aplicaciones_industriales_del_calentamiento_con_energia_microondas).
- Narváes S. A. U., Martínez S. T., & Jiménez V. M. A. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*. (56): 33-44.
- Nieto A. R., Vargas M. J., Nieto A. J. C., Rodríguez O. A., Jiménez P. M. V., Hernández C. J., & Ortíz B. M. (2016). *UPFIM*. Obtenido de [https://upfim.edu.mx/wp-content/investigacion/libros/MagueyPulquero.pdf?\\_t=1660859095](https://upfim.edu.mx/wp-content/investigacion/libros/MagueyPulquero.pdf?_t=1660859095)
- Oliveros, M. R., Paredes L. O. (2012). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica L.*). *J. Agric. Food Chem.* 61(1): 193-201. <https://doi.org/10.1021/jf3034978>
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current biology*. (27): 853-909. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.050>
- Peña, V. C. B., Sanchez, U. A. B., Aguirre, R., J. R., Trejo, C., Cardenas, E., & Villegas M, A. (2006). Temperature and mechanical scarification on seed germination of 'maguey'

- (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Seed Science and Technology*. 34(1): 47-56. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2006.34.1.06>.
- Pérez, E. V. H., Cuervo, P. J.A., Aparicio, B. J. E., Morales, O. M. A., Peralta, G. M., Romero, C. T. (2022). Importancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck spp. *salmiana*. *Revista mexicana de ciencias forestales*. 13(70): 166-176. DOI: 10.29298/rmcf.v13i70.1265
- Pita V. J., & Pérez G. F. (1998). Germinación de semillas. Hojas divulgadoras. *Ministerio de agricultura pesca y alimentacion*. Num. 2090. Madrid, España. Consultado [22/10/2023] Obtenido de [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1998\\_2090.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf)
- Prerez R. J., Mejia, C. J. A., Hernández, L. A., & Zamora, D. M. (2015). Ausencia de latencia en semilla de genotipos mexicanos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) para malta. *Revista fitotecnía mexicana*. 38(3): 249-255.
- Puente Garza , C. A., Gutiérrez Mora, A., & García Lara, S. (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01026>
- Shewry, P. R., Napier, J. A., & Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*. 7(7): 945-956. <https://doi.org/10.1105/2Ftpc.7.7.945>
- Sun, J., Wang, W. & Yue, Q. (2016). Review on Microwave-Matter Interaction Fundamentals and Efficient Microwave-Associated Heating Strategies. *Materials*. 9 (231): 1-25 231; doi:10.3390/ma9040231
- Ramírez T. H. M., Niño V. R., Aguirre R. J. R., Flores , J., De-Nova Vázquez , J. A., & Jarquin G. R. (2015). Seed viability and effect of temperature on germination of *Agave angustifolia* subsp. tequilana and *A. mapisaga*; two useful *Agave* species. *Springer*. 63(5): 1-8 <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-015-0291-x>
- Ramírez, T. H. M., Peña, V. C. B., Trejo , C., Aguirre, R, J. R., & Vaquera H., H. (2014). Seed germination of *Agave* species as influenced by substrate water potential . *Biological Research*. 47(11): 2-9.
- Salomón, D. J., González, C. M., Castillo, H. , J., & Varela, N. M. (2017). Efecto de los rayos gamma sobre la germinación de la semilla botanica de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos tropicales*. 38(1): 89-91.
- SCAI. (2022). Microscopia electrónica de barrido. SCAI. Obtenido de <https://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem.html>.
- SIAP. (2017). Maguey: un agave que nos provee diversos productos agroalimentarios nativos. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Obtenido de <https://www.gob.mx/siap/articulos/maguey-un-agave-que-nos-provee-diversos-productos-agroalimentarios-nativos?idiom=es>

- Tigabu, M., & Oden, P. C. (2001). Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Science and Technology*. 29(1): 11-20.
- Trejo, S. R. E., Scheinvar, E., Eguiarte, L. E. (2015). ¿Quién poliniza realmente los agaves? Diversidad de variantes florales en 3 especies de *Agave* (*Agavoideae: Asparagaceae*). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86(2): 358-369. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.04.007>
- Valenzuela B., R., Tapia O., G., González E., M., & Valenzuela B., A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista chilena de nutrición*. 38(3): 356-367 <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182011000300011>
- Vargas, V. L. P., Uscanga, M. E., Padilla C. D., Vibrans, H., Kohashi, S. J., Miranda, C. S., & Yáñez, J. P. (2020). Asignación de biomasa y carbohidratos en semillas y plántulas de *Phaseolus coccineus* L. domesticado y silvestre. *Biotanical Sciences*. 98(2): 366-376 <https://doi.org/10.17129/botsci.2485>.
- Vázquez, D. E., García, N. J. R., Peña, V. C. B., Ramírez, T. H. M., & Morales, R. V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista fitotecnica mexicana*. 34(3): 167-173.
- Vázquez, G. A. (2018). Usos, prácticas culturales y capital natural del maguey pulquero (*Agave salmiana*) en dos grupos étnicos, en el territorio del Altiplano Central Mexicano. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Obtenido de [https://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/3040/Vazquez\\_Garcia\\_A\\_EDAR\\_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/3040/Vazquez_Garcia_A_EDAR_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vázquez, G. A., Aliphath, F. M. M., Estrella, C. N., Ortiz, T. E., Ramírez, J. J., & Ramirez M. A. (2016). El maguey pulquero, una planta multifuncional y polifacética: los usos desde una visión mestiza e indígena. *Scripta Ethnologica*: 38 65-88.
- Young, H. & Freedman R. (2009). Física universitaria con física moderna. *Pearson Education*.

## APÉNDICE A

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA MÉTODO DE BRADFORD.

Curva Patrón:

1. Preparar una solución de BSA que contenga 200  $\mu\text{g/mL}$  y diluir de acuerdo con la Tabla 11. Colocar 20  $\mu\text{L}$  de cada estándar y de las muestras en un tubo de ensaye limpio y seco.

Ensayar por duplicado o triplicado las soluciones de proteína.

2. Añadir 1 mL del reactivo de Bradford diluido a cada tubo y agite con vortex.

3. Incubar a temperatura ambiente por 20 min.

4. Medir la absorbencia a 595 nm.

Tabla 11. Diluciones empleadas para la curva patrón BSA.

No. Tubo	Sol. BSA ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O destilada ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	25	275	16.67
2	50	250	33.33
3	75	225	50
4	100	200	66.67
5	150	150	100
6	200	100	133.33
7	250	50	166.67
8	300	0	200

Comentarios:

El blanco en lugar de muestra llevaba agua destilada. Simultáneamente se preparó una curva patrón con albúmina de suero bovina (BSA).

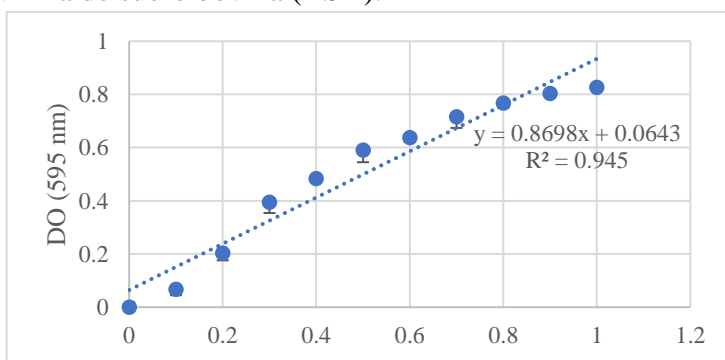


Figura 21. Curva patrón de BSA.

## **APENDICE B**

### **MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS, GRASAS Y CARBOHIDRATOS.**

#### **Métodos de cuantificación de proteínas.**

Para la determinación de la concentración de proteínas de una muestra biológica existen varios métodos que se pueden emplear, mismos que se basan en características como: 1) La propiedad intrínseca de las proteínas para absorber la luz UV. 2) La formación de derivados químicos. 3) La capacidad de las proteínas para unirse a ciertos colorantes.

#### **Método de Bradford.**

Este método se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 con los residuos de aminoácidos básicos (histidina, arginina y lisina). Se caracteriza por la observación de que el Azul de Coomassie G-250 existe en dos diferentes formas coloridas: rojo y azul. Su forma roja se torna azul cuando el colorante se une a la proteína. La variación de absorbancia del Azul de Coomassie G-250, es proporcional a la cantidad de colorante unido a las proteínas por lo que también es proporcional a la concentración de proteínas en una solución.

#### **Método Lowry.**

Este método se basa en el uso de una mezcla que contiene molibdato, tungstato y ácido fosfórico. Dicha mezcla sufre una reducción cuando reaccionan con proteínas en la presencia del catalizador cobre (II). Esta reducción ocurre a través de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como: tirosina, triptófano, cisteína, asparagina e histidina. De modo que este ensayo combina dos reacciones, primero la reacción de iones de cobre con los enlaces peptídicos en un medio alcalino que origina complejos color violeta, y la segunda que causa la reducción del reagente Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico que causa un cambio en la coloración a azul oscuro. El espectro de absorción de este método se encuentra en un máximo de 750 nm y su intensidad es proporcional a la cantidad de proteínas en la muestra (Marques, 2018).

#### **Métodos de cuantificación de grasas.**

#### **Método Soxhlet.**

Método que se basa en la extracción de grasas empleando un disolvente orgánico. El disolvente se calienta hasta su ebullición y se condensa goteando sobre la muestra de interés la cual queda sumergida en dicho disolvente, este proceso se repetirá las veces necesarias para extraer por completo todas las grasas de la muestra. Una vez que el disolvente contiene todas las grasas, se calentará hasta su punto de ebullición. Finalmente, el contenido de grasas se cuantificará por diferencia de peso. (UNED, 2004)

### **Métodos de cuantificación de carbohidratos.**

#### **Método de fenol-sulfúrico.**

Es un método espectrofotométrico que se fundamenta en que los carbohidratos en medios ácidos y con temperaturas elevadas sufren deshidrataciones simples y producen derivados del furano que se condensan con el fenol que dan como resultados compuestos coloridos. Que se medirán a una absorbancia de 490 nm y se cuantificarán con ayuda de una curva de calibración (Iturbe & Sandoval, 2011).

#### **Técnica de análisis estructural.**

##### **Micrografías por Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).**

El microscopio electrónico de barrido o MEB (Scanning Electron Microscope), es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen (Fernández, 2020). Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con detectores que recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de esta, para crear una imagen que refleja las características superficiales de la muestra, proporcionando información acerca de las formas y texturas de esta (SCAI, 2022).

En el microscopio electrónico de barrido la muestra generalmente es recubierta con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro para darle propiedades conductoras a la muestra. Posteriormente, es barrida con los electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen de TV o una imagen digital. Su resolución está entre 4 y 20 nm, dependiendo del microscopio. Inventado en 1931 por Ernst Ruska, permite una aproximación profunda al mundo atómico.

Permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos (Fernández, 2020).

Con la microscopia de barrido es posible estudiar distintos tipos de materiales como:

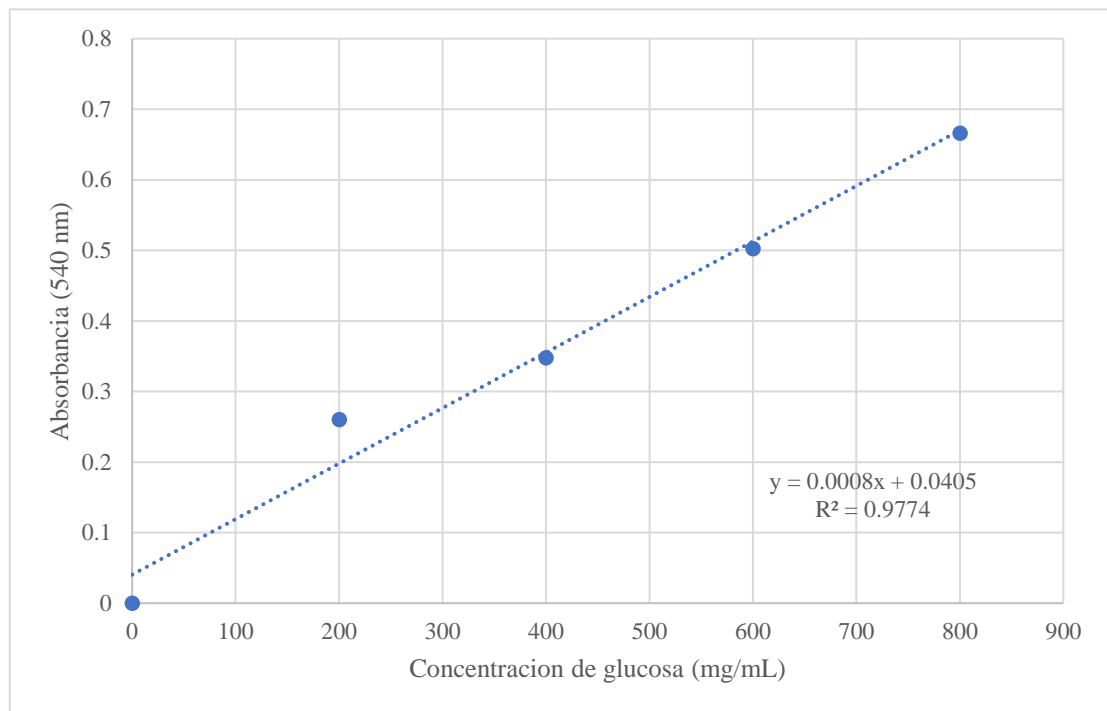
- Metales: aluminio, acero, titanio, cobre, metales preciosos, etc.
- Cerámicas: zirconia, carburo, piedra, porcelana etc.
- Polímeros: termoplásticos, termoestables y elastómeros.
- Orgánicos: algodón, madera, bacterias, células, etc.
- Composites: fibra de carbón, fibra de vidrio, grafito etc.

## APENDICE C

### Curva de DNS.

Leer la absorbancia de cada una de las muestras y hacer la interpolación de los datos en la curva patrón para determinar la concentración de azúcares reductores.

La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determinó haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado glucosa Figura 22, graficando la absorbancia en función de la concentración. Para obtener esta curva se prepararon soluciones de 200-1000 mg/L.



*Figura 22. Curva DNS*



## APENDICE D

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS SDS-PAGE

Acrilamida (29:1) 30% p/v

Acrilamida	29 g
N,N'-Methylen bisacrilamida	1 g
Agua bidestilada	completar a 100 mL

Buffer gel separador: 1.5 M Tris-Cl, pH 8.8

Agua bidestilada	30 mL
Tris base	9.08 g
HCl dil. 1:1 v/v	1.6 mL
Ajustar a pH 8.8 con HCl dil. 1:1	
Volumen final:	50 mL.

Buffer gel concentrador: 1.0 M Tris-Cl, pH 6.9

Agua bidestilada	6 mL
Tris base	1.21 g
HCl dil. 1:1 v/v	1.4 mL
Ajustar a pH 6.9 con HCl dil. 1:1	
Volumen final:	10 mL

Persulfato de amonio

Persulfato de amonio 10% p/v

Persulfato de amonio 0.1 g

Agua bidestilada a completar 1 mL

Buffer de corrida

Agua bidestilada	500 mL
Tris base	5 g
Glicina	5 g
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	0.5 g

Buffer de muestra (corrido) 4X

Tris-Cl 1M, pH 6.9	250 $\mu$ l
Glicerol 80% v/v en agua	250 $\mu$ l
SDS 20% p/v en agua	400 $\mu$ l
beta-Mercaptoetanol	100 $\mu$ l
Azul de bromofenol	0.1 mg
Volumen final:	1 mL

Buffer de muestra (corrido) 2X

Agua bidestilada	500 $\mu$ l	
Tris-Cl 1M, pH 6.9	125 $\mu$ l	
Glicerol 80% en agua	125 $\mu$ l	
	SDS 20% en agua	200 $\mu$ l
beta-Mercaptoetanol	50 $\mu$ l	

## PREPARACIÓN DE GELES

Tabla 12. Componentes y cantidades requeridas para gel separador a diferentes porcentajes.

Componentes del Gel Separador (4 mL)	Rango óptimo de masa molecular (kDa) de la cadena polipeptídica.				
	40-180 9% T	30-160 0.5% T	20-150 12% T	15-130 13.5% T	10-100 15%T
Agua	1.77 mL	1.57 mL	1.37 mL	1.17 mL	0.97 mL
Acrilamida 30%	1.2 mL	1.4 mL	1.6 mL	1.8 mL	2 mL
Tris-Cl pH 8.8	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Persulfato 10%	22 $\mu$ l	21 $\mu$ l	20 $\mu$ l	19 $\mu$ l	18 $\mu$ l
TEMED 50% v/v	10 $\mu$ l	9 $\mu$ l	8 $\mu$ l	7 $\mu$ l	6 $\mu$ l
<b>Gel Separador (5mL)</b>	<b>8 % T</b>	<b>6% T</b>			
Agua	2.3 mL	2.6 mL			
Acrilamida 30%	1.3 mL	1.0 mL			
Tris-Cl pH 8.8	1.3 mL	1.3 mL			
SDS 10%	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l			
Persulfato 10%	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l			
TEMED 50% v/v	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l			

Gel Concentrador 3.9% T (1 mL)

Agua	730 $\mu$ l
Acrilamida 30%	130 $\mu$ l
Tris-Cl pH 6.9	125 $\mu$ l
SDS 20%	5 $\mu$ l
Persulfato 10% p/v	8 $\mu$ l
TEMED 50% v/v	2 $\mu$ l

\* Los volúmenes indicados son para 4 mL de gel separador y 1 mL de gel concentrador, suficiente para preparar un (mini)gel de 8x10 cm, con separadores de 0.75 mm.

### **Preparación del desteñidor de geles.**

Medir en una probeta 1100 mL de agua destilada y transvasar al recipiente de 2 L etiquetado como “desteñidor de geles”. – Medir en una probeta 800 mL de etanol, y transvasar al recipiente de 2 L, medir en una probeta 100 mL de ácido acético, y agregar al recipiente de 2 L. – Homogeneizar la mezcla, cerrando el recipiente e invirtiéndolo un par de veces.

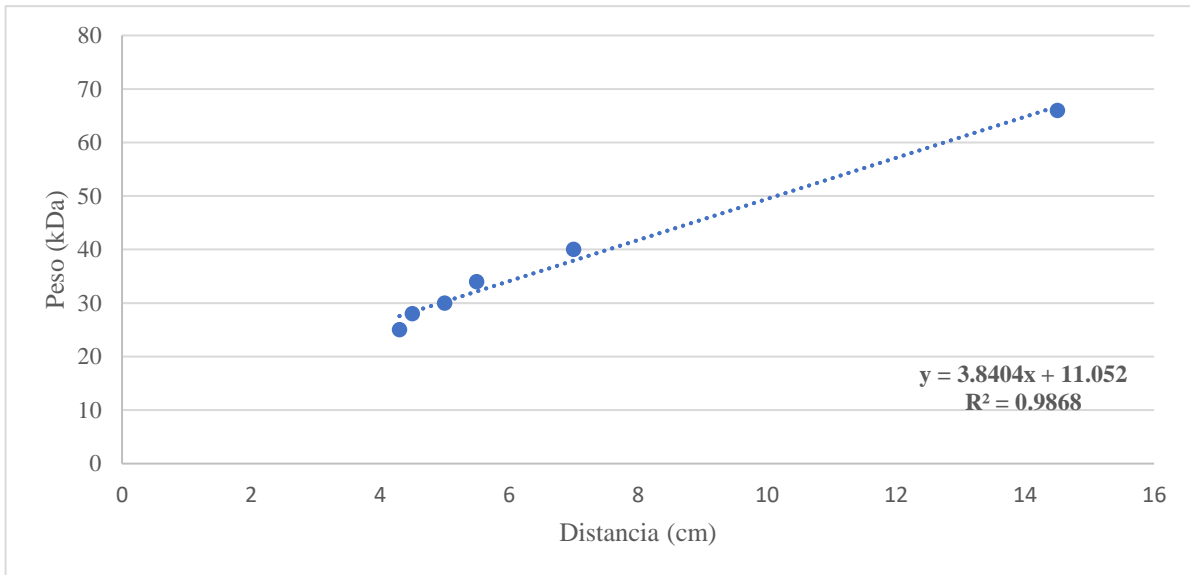
### **Preparación de geles SDS-PAGE.**

1. La mayoría de las cámaras de electroforesis parten del mismo principio técnico. Realizar la preparación del gel de resolución a una concentración de acuerdo con las necesidades de la muestra, mezclando los componentes en el orden que se indica en la sección de reactivos.
2. Preparar aproximadamente 5 mL de solución deberán ser preparados para el gel de corrido por el tamaño de los geles pequeños de aproximadamente 8 - 10 cm de ancho por 5 - 7 cm de largo y un espesor de 0,7 - 0,8 mm.
3. Agregar la solución de poliacrilamida preparada entre las placas de vidrio hasta la línea trazada (como referencia). Posteriormente, añadir una capa de butanol-agua (aproximadamente 100  $\mu$ L), agua o limpiar los vidrios previamente con la solución de SDS (10%) sobre la solución de poliacrilamida para evitar el ingreso de moléculas de oxígeno que retarden la polimerización.
4. Dejar polimerizar el gel a temperatura ambiente por 15 a 30 min.
5. Una vez formado el gel, descartar la capa de butanol o agua y lavar la parte superior del gel varias veces con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada y butanol.
6. Posteriormente agregar la solución preparada para el gel de empaquetamiento entre los vidrios y sobre el gel de corrido ya polimerizado. Inmediatamente después de agregar la solución, colocar el peine entre ambos vidrios secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que lleguen a derramarse.
7. Dejar polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente por 15 a 30 min.
8. Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente y lavar todos los pocillos ya formados con chorro suave de agua destilada.

## APENDICE E

### Curva patrón SDS-PAGE.

El peso de las bandas en los geles obtenidos (SDS-PAGE) se determinó haciendo una interpolación en la curva patrón (Figura 23) de los pesos de las muestras conocidas, graficando la distancia en gel en función a su peso.



*Figura 23. Curva patrón SDS-PAGE*