



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

LABORATORIO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PECTINA EXTRAÍDA
DE CÁSCARA DE TORONJA EN UN REACTOR
TERMOMECAÑOQUÍMICO**

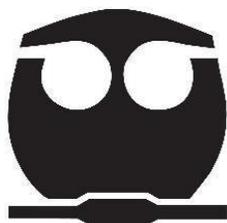
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MONTSERRAT VÁZQUEZ ALCÁNTAR



CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: EDUARDO BARZANA GARCIA
VOCAL: Profesora: INES MIRANDA MARTINEZ
SECRETARIO: Profesor: OSCAR HERNANDEZ MELENDEZ
1er. SUPLENTE: Profesora: MA. ROSA GONZALEZ TEPALE
2° SUPLENTE: Profesor: ROEB GARCIA ARRAZOLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL, FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.

ASESOR DEL TEMA: OSCAR HERNÁNDEZ MELÉNDEZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): MONTSERRAT VÁZQUEZ ALCÁNTAR

(nombre (s) y firma (s))

AGRADECIMIENTOS

Por el financiamiento del proyecto:

- A la UNAM, a través de la DGAPA (PAPIIT IA-204415).
- A grupo BIOTECSA S.A. de C.V. y NOVOZYMES[®] por la donación de enzimas para el presente trabajo.
- Al Dr. Eduardo Barzana, por el gran apoyo y asesoría a lo largo de la gestión experimental de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I. RESUMEN	6
CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Planteamiento del problema	7
2.2 Objetivo general	7
2.3 Objetivos particulares	8
2.4 Hipótesis del trabajo	8
CAPÍTULO III. ANTECEDENTES	9
3.1 Descripción botánica	9
3.2 Comercialización	10
3.3 Características físicas de la toronja	11
3.4 Productos y usos de la toronja	11
3.5 Principales países productores de toronja	11
3.6 Pectinas	12
3.6.1 Estructura.	13
3.7 Aspectos generales de las enzimas pécticas	14
3.7.1 Poligalacturonasas.	15
3.8 Oligogalacturónidos	16
3.8.1 Actividad biológica en plantas.	17
3.8.2 OGs como estimulantes en respuestas de defensa.	19
3.8.3 OGs como reguladores de crecimiento y	

desarrollo en plantas.	23
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Procedimiento experimental	24
4.2 Materiales	25
4.3 Metodología	26
4.3.1 Materia prima.	26
4.3.2 Obtención de pectina.	26
4.3.3 Hidrólisis de pectina.	29
4.3.4 Método ácido dinitrosalicílico (DNS).	31
4.3.5 Reacción con Carbazol.	32
4.3.6 Técnica de cromatografía en capa fina.	33
4.3.7 Prueba de oligogalacturónidos en semillas de rábano.	34
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS	56
CAPÍTULO VIII. ANEXOS	63
8.1 Análisis de varianzas (ANOVA).	63
8.2 Cromatografía en capa fina.	65

CAPÍTULO I.

RESUMEN

El interés social por la conservación del medio ambiente ha resultado en la aparición de legislaciones ambientales más severas y cambios de política fiscal que buscan impulsar a la industria química y reducir su impacto ambiental. Por tal motivo, está ganando interés la utilización de residuos agroindustriales, como materia prima de bajo costo. Esta opción de transformar desechos en nuevas materias primas se perfila como una alternativa atractiva para obtener compuestos que son económica o técnicamente inviables de conseguir por síntesis química tradicional.

Esta situación hace deseable el aprovechamiento de los desechos de origen cítrico para la generación de productos de alto valor agregado. Recientes investigaciones promueven el uso de productos bioactivos, como sustituto de los productos de origen químico dado los efectos beneficiosos que ejercen en las plantas (Pospienzny, *et al.*, 1999).

El empleo de moléculas bioactivas como los oligogalacturónidos ejercen los mismos beneficios en las plantas en comparación con los reguladores de crecimiento (ácido indolbutírico), dentro de los cuales se encuentran la inducción de mecanismos defensivos y la estimulación del crecimiento vegetal, con la ventaja adicional de ser inocuos al medio ambiente (Hernández, *et al.*, 2006).

El propósito del presente trabajo es el aprovechamiento de desechos de la industria citrícola, en este caso, cáscara de toronja, para su transformación en oligogalacturónidos vía enzimática, los cuales constituyen una alternativa que puede ser empleada como productos bioactivos en la agricultura.

CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En algunos países en desarrollo, el crecimiento de la población está ocurriendo a una velocidad mayor que la producción agrícola. La introducción de nuevos sistemas agrícolas y de tecnologías mejoradas es de vital importancia, dado que la mejora de la productividad resulta no sólo en más alimentos sino también en mayores ingresos (FAO, 2002).

En nuestro país un elevado porcentaje de áreas agrícolas se han visto afectadas por diferentes fenómenos que afectan los cultivos y su rendimiento, para lo cual se desarrollan numerosas investigaciones encaminadas a lograr variedades más resistentes a estas condiciones. Sin embargo, los campesinos necesitan de alternativas rápidas y de fácil acceso como el empleo de productos que tengan un efecto benéfico sobre las plantas y con ello lograr mantener un buen rendimiento de los cultivos (Álvarez, et al., 2011).

2.2. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones experimentales más adecuadas para recuperar oligogalacturónidos y/o ácido galacturónico a partir de pectina de origen cítrico obtenida mediante el uso de enzimas comerciales.

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de pectina a partir de residuos de cáscara de toronja utilizando un reactor termomecanoquímico y un filtro prensa.
- Determinar el contenido de ácido galacturónico y azúcares reductores presentes en una mezcla de oligogalacturónidos empleando un método espectrofotométrico de análisis.
- Caracterizar los oligogalacturónidos empleando la técnica de cromatografía en capa fina y marcadores de peso molecular como referencias.
- Evaluación de oligogalacturónidos en semillas de rábano variedad "Champion".

2.4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

La hidrólisis enzimática de pectina permite obtener oligogalacturónidos (con bajo-nulo grado de metoxilación obtenida en el laboratorio).

Las cinco variables a estudiar que determinan los mejores rendimientos son: temperatura, tiempo de reacción, carga de enzima (proveniente de un par de cocteles comerciales), concentración de sustrato y diferentes cantidades de ácido galacturónico.

CAPÍTULO III. ANTECEDENTES

El sureste de México es una de las principales regiones productoras de cítricos del país, donde se genera gran volumen de desechos sólidos de cítricos (cáscara). Este desecho proviene de la obtención de jugos que, normalmente, se envía a tiraderos a suelo abierto, generando un problema serio de contaminación. Uno de los cítricos de mayor importancia comercial es la toronja.

3.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La toronja o pomelo (*Citrus paradisi*) al igual que otros cítricos pertenece a la familia rutácea. Esta familia está formada por más de 1,600 especies, siendo el género *Citrus* el más importante. Hay unas 20 especies con frutas comestibles, todas ellas muy abundantes en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales. Normalmente, la fruta tiene un diámetro de 10 a 15 centímetros y pesa entre 200 y 400 gramos (García, 2008).

Existen diferentes teorías de cómo fue descubierto, algunos creen que fue descubierto por unos botánicos en las islas Barbados en el siglo XVII, otros mantienen que fue detectado por primera vez en Puerto Rico a mediados del siglo XVIII. Hoy en día, Florida es una de las áreas de cultivo más importantes en el mundo (García, et al., 2010).

3.2. COMERCIALIZACIÓN

Los principales canales de comercialización de la toronja se presentan en la Figura 1. El canal máspreciado es el mercado en fresco y especialmente el mercado de exportación, por lo que los productores prefieren vender su cosecha a las emparadoras. En cambio, los que no tienen esta oportunidad la venden a intermediarios, quienes llevan la producción al mercado nacional, principalmente a la central de abastos en la Ciudad de México, centrales de otros estados o de Veracruz. Otros venden a empresas procesadoras que producen gajos (gajera), o jugo (juguera), a precios generalmente bajos.



Figura 1. Principales canales de comercialización de toronja.

Existen grandes productores que tienen su producción destinada al mercado en fresco de exportación, y los principales mercados de destino son Estados-Unidos, Canadá y Europa (García, *et al.*, 2010).

3.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA TORONJA

En función a la tonalidad de la pulpa del fruto, existen dos grupos de variedades: las blancas y las pigmentadas. La diferencia entre ellas son las características de sus frutos, principalmente el color de la pulpa, que va de translúcido a amarillo y de rosa tenue a rojo, respectivamente. Las variedades blancas fueron las primeras y más cultivadas, pero en las últimas décadas están siendo desplazadas por las variedades de pulpa pigmentada. Su popularidad y consumo se ha incrementado en las dos últimas décadas en muchos países (García, *et al.*, 2010).

3.4. PRODUCTOS Y USOS DE LA TORONJA

Los frutos en fresco se consumen en forma de jugo (zumo), tanto naturales como concentrados, en gajos para adorno de pasteles y postres, así como transformados en la fabricación de mermeladas. La industria aprovecha un 20% de la producción, principalmente para la elaboración de jugos, refrescos y pequeñas cantidades para mermeladas (García, *et al.*, 2010).

De la cáscara se extrae un aceite esencial muy utilizado en perfumería, cosméticos y en la industria de alimentos.

3.5. PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE TORONJA

México es el 4to productor mundial de cítricos a nivel mundial, después de China, Brasil y E.U., con una contribución del 6.19%. Sin embargo, ocupa el 3er lugar en producción de toronja, con un 5.55% después de China y E.U., con una contribución de 48.74% y 13.81% respectivamente (FAO, 2015).

3.6. PECTINAS

Las sustancias pécticas son macromoléculas de naturaleza glucídica, de origen exclusivamente vegetal y compuestas esencialmente de ácido galacturónico polimerizado. Se les encuentra en la mayor parte de los tejidos vegetales, donde desempeñan una importante función en el mantenimiento de su textura (Navarro, 2014).

La palabra *pectina* se deriva del griego *pectos*, que significa solidificar. En 1944, la Sociedad de Química Americana define a las pectinas como: *Sustancias coloidales que se encuentran en las plantas y contienen una gran proporción de polímeros de alto peso molecular de ácido galacturónico; los grupos carboxilo de estos ácidos pueden estar esterificados por metanol en una proporción variable y parcial o completamente neutralizados por uno o varios cationes metálicos* (Kertesz, et al., 1944).

Según su estructura se las clasifica en los siguientes grupos:

Protopectina. Término aplicado a las sustancias pécticas insolubles en agua y que bajo condiciones controladas de hidrólisis originan *ácidos pectínicos*.

Ácidos pectínicos: Son los ácidos poligalacturónicos coloidales que contienen una apreciable proporción de grupos metil-éster. Estos ácidos bajo condiciones adecuadas son capaces de formar geles con azúcar y ácido, o si presentan un bajo contenido de metoxilo, con determinados iones metálicos. Las sales de los ácidos pectínicos se denominan *pectinatos*.

Pectinas: Son aquellos ácidos pectínicos solubles en agua, de elevado contenido en ésteres metálicos y grado de neutralización, capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones adecuadas.

Ácidos pécticos: Son aquellas sustancias pécticas constituidas principalmente por ácidos poligalacturónicos prácticamente libres de grupos metoxilo. Las sales de estos ácidos se denominan *pectatos*.

Las sustancias pécticas de los tejidos vegetales y las enzimas que las degradan tienen una enorme importancia en la industria agroalimentaria. Por una parte, desempeñan papeles esenciales en las estructuras de los órganos celulares durante la maduración, almacenamiento, etc. Por otra parte, en las técnicas de transformación industrial, tales como extracción, clarificación, etc., de jugos de frutos; una vez extraídas de los órganos que las contienen, son utilizadas como aditivos alimenticios aprovechando sus propiedades gelificantes, espesantes, etc. (Navarro, 2014).

3.6.1. Estructura.

Las sustancias pécticas se consideran como un conjunto de polisacáridos de diferente composición química, pero con similar solubilidad. Los componentes esenciales en todas ellas son: galacturonano (polímeros de ácido galacturónico), ramnogalacturonanos (polímeros constituidos por ramnosa y ácido galacturónico), arabinanos (polímeros de arabinosa), galactanos (polímeros de galactosa) y arabinogalactanos (polímeros constituidos por arabinosa y galactosa).

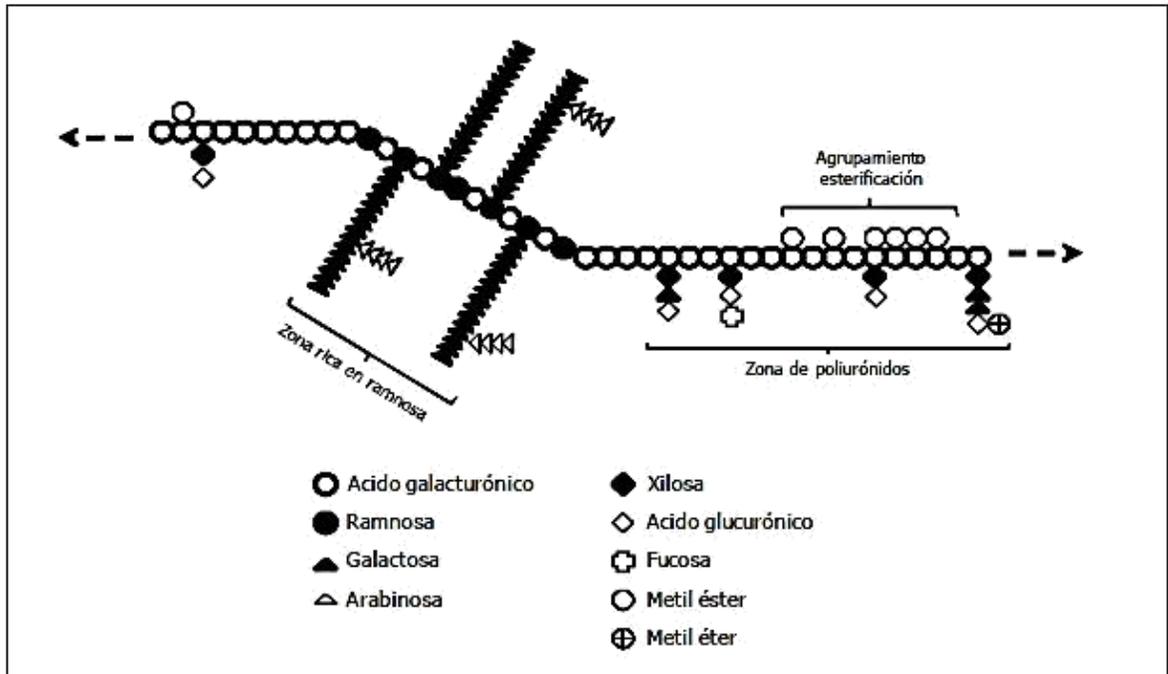


Figura 2. Esquema general de una pectina con las posibles ramificaciones de su cadena principal.

3.7. ASPECTOS GENERALES DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS

Las enzimas pécticas son aquellas que degradan las sustancias pécticas como sustratos naturales, pueden aparecer en las plantas superiores o ser producidas por diferentes microorganismos. Las enzimas pécticas endógenas son capaces de producir importantes cambios estructurales en los frutos y vegetales durante la maduración y su almacenamiento. La activación o inactivación de estas enzimas tiene una influencia decisiva sobre las etapas del procesamiento de estos productos (Fernández, *et al.*, 1995).

Las enzimas pécticas microbianas son determinantes en la patología vegetal y los alimentos fermentados, pero también son producidos por vía biotecnológica para su utilización en la industria alimenticia.

Estas pueden clasificarse en dos grupos, dependiendo del tipo de actividad que catalizan: desesterificantes (pectina esterasas) y depolimerizantes.

Las enzimas incluidas en este grupo pueden atacar preferentemente a las zonas lineales (HG) o ramificadas (RG) (Fernando, 2003).

Las endopoligalacturonasas (endo-PG) actúan sobre el ácido poligalacturónico o ácidos pécticos liberando monómeros de ácidos galacturónicos u oligómeros (Fernando, 2003). Su acción puede dividirse en dos subclases, según corten una cadena de homogalacturanos: un ataque múltiple (a cadena simple) o la separación del sustrato luego del corte para unirse a un nuevo blanco (ataque simple a cadenas múltiples) (Fogarty & Kelly, 1983).

Las endopoligalacturonasas son producidas por una gran variedad de microorganismos, tales como los hongos, las bacterias, las plantas, están involucradas en muchos procesos fisiológicos y patológicos, caracterizados por la degradación y remodelación de la pared celular de las plantas. Las poligalacturonasas fúngicas que presentan carácter endo en su modo de acción, catalizan la fragmentación y solubilización de los polímeros pécticos por la escisión de los enlaces internos de los homogalacturanos (Federeci, *et al.*, 2001).

3.7.1. Poligalacturonasas.

Existen diferentes reportes en la literatura referidos al método de obtención de los oligogalacturónidos mediante hidrólisis enzimática donde se aprecia un gran empleo de pectinasas (Favela, *et al.*, 2006) y particularmente el uso de endopoligalacturonasas preparadas a partir de *Aspergillus niger* (Goubet, *et al.*, 2006), *Fusarium moniliforme* (Spiro, *et*

al., 2002), con las cuales se obtienen oligogalacturónidos con un grado de polimerización muy variable.

Las poligalacturonasas constituyen depolimerasas que presentan actividad endopoligalacturonasa y exopoligalacturonasa, la acción enzimática de las primeras generan una hidrólisis aleatoria del enlace O-glicosídico en las uniones 1,4- α -D-galactosilurónicas de los homogalacturonos, mientras que las segundas degradan a los poligalacturonatos mediante la hidrólisis de los enlaces glicosídicos del extremo no-reductor de la cadena, produciendo el 1,4- α -D-galacturónido y el ácido galacturónico correspondiente. Las poligalacturonasas presentan una actividad máxima a valores de pH relativamente ácidos y temperaturas que oscilan entre 30-50°C (Gummadi, Manoj & Kumar, 2006).

En el presente trabajo se emplearon preparados enzimáticos comerciales, Pectinex Ultra SPL, obtenido del *Aspergillus aculeatus* y el Pectinex 3XL obtenido de *Aspergillus niger*.

3.8. OLIGOGALCTURÓNIDOS

La primera evidencia acerca de que los fragmentos de pectina inducen respuestas de defensa fueron proporcionadas hace 30 años por experimentación en la acumulación de fitoalexinas en cotiledones de soya (Hahn et al., 1981). Estos fragmentos, llamados desencadenantes endógenos, posteriormente fueron identificados como oligómeros de galacturonósidos residuales con enlaces alfa-1,4 (oligogalacturónidos, OGs) que, pueden ser obtenidos por medio de una hidrólisis del ácido poligalacturónido (Nothnagel et al., 1983). Se especulaba que la degradación de un fragmento grande de pectina, como el homogalacturonano (HGA), ocurría durante infecciones microbianas que

podrían causar la acumulación de OGs que desencadenen respuestas defensivas. En ese momento, se demostró que la digestión de HGA por un hongo o una poligalacturonasa (PG) derivada de tomate liberaba un inductor de un inhibidor de proteinasa (IP) inducible por heridas, sugiriendo un papel de OGs en respuesta a la herida (Bishop et al., 1981).

Algunos años después se reportó que los OGs antagonizan la actividad de auxinas durante la elongación del tallo de los guisantes, mostrando un posible rol de estos oligosacáridos como reguladores del crecimiento y desarrollo (Branca et al., 1988). En años subsecuentes se realizaron esfuerzos para elucidar el mecanismo de acción de los OGs e investigar su habilidad para activar las defensas de las plantas, así como su efecto como antagonistas locales de las auxinas en el crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, sólo recientemente se han logrado avances significativos en la comprensión de las bases de la percepción de OGs y la transducción de señales (Ferrari et al., 2013).

3.8.1. Actividad biológica en plantas.

Los carbohidratos que actúan como moléculas señalizadoras en las plantas se denominan oligosacarinas, que se extraen de los polisacáridos de la pared celular de plantas y hongos, a partir de los simbiontes bacterianos de las plantas. Los oligogalacturónidos son oligosacarinas derivadas de la pared celular de las plantas que liberan respuestas biológicas en éstas (Spiro, *et al.*, 1998).

Los efectos biológicos liberados en las plantas por las oligosacarinas son diversos, pero generalmente pueden ser ubicados en dos grupos: respuestas retardadas y respuestas rápidas. Las retardadas son observadas horas y días después del tratamiento con las oligosacarinas y frecuentemente están envueltas en la adaptación de las condiciones

medioambientales. Las rápidas generalmente se observan en la superficie celular de las plantas unos minutos después de haberse añadido las oligosacarinas (Spiro, *et al.*, 1998).

Las respuestas retardadas liberadas por los oligogalacturónidos pueden ser ampliamente divididas en aquellas que inducen respuestas defensivas y las que modifican el crecimiento y desarrollo. Aquellas relacionadas con la defensa, dependiendo de la especie de la planta, incluyen la acumulación de fitoalexinas, lignificación de las paredes celulares y acumulación de inhibidores de proteasa, que requieren la presencia del extremo reductor en el carbono C-1 de los di y trigalacturónidos (Spiro, *et al.*, 1998).

Los estudios realizados (Sibise, *et al.*, 2005) con una mezcla de oligogalacturónidos bioactivos con grado de polimerización entre 8 y 16 mostraron incrementos altamente significativos en el crecimiento (altura, diámetro del tallo, longitud radical) del Tagasaste.

Estos resultados fueron consistentes con estudios anteriores (Costales, *et al.*, 2007), al emplear la misma mezcla en semillas de tomate de la variedad Amalia, encontrando cierta relación entre la concentración de oligogalacturónidos empleada y el momento de la siembra de las semillas.

Al realizar un estudio sobre el efecto antagónico que manifiestan en la alcalinización extracelular los ácidos oligogalacturónidos y el ácido indolacético en raíces de pepino, algunos autores (Spiro, *et al.*, 2002) plantean que los oligogalacturónidos con un grado de polimerización (GP) entre 10 y 14 son más activos que aquellos fuera del rango. Dentro de este rango, los OGs que presentan la mayor actividad son los que tienen un GP entre 10 y 12, seguidos por aquellos con un GP de 13.

Los OGs con un GP de 9, 14 y 16 presentan una actividad mucho menor que la de los OGs con un GP de 10-12 y 13. Por su parte, los OGs con un GP de 3, 5 y 7 no inducen respuestas de alcalinización.

Sin embargo, existen informes de que los oligómeros de pequeño tamaño, incapaces de formar complejos con el Ca^{2+} , también son capaces de inducir efectos en plantas (Simpson, *et al.*, 1998); ejemplo de esto son los estudios realizados por Bishop *et al.*, 1984, al observar las heridas en plantas de tomate, encontrando que los oligogalacturónidos con GP 2-9 inducen la producción de proteínas inhibidoras de proteasa.

Las pectinasas se consideran de importancia crucial en el proceso infectivo, ya que degradan las pectinas de la laminilla media y de la pared primaria de las células, ayudando a la colonización de los tejidos vegetales y proporcionando nutrientes para el hongo durante etapas tempranas de patogénesis (Negrillo, *et al.*, 2005).

3.8.2. OGs como estimulantes en respuestas de defensa.

Los agentes patógenos deben ser reconocidos oportunamente por el hospedero con el fin de activar las defensas adecuadas que restrinjan la invasión y colonización.

Una característica crucial del sistema inmune innato tanto en plantas como en animales es la capacidad de detectar un peligro potencial mediante el reconocimiento de moléculas que alertan a la célula. Las moléculas asociadas con microorganismos patógenos (microorganismos asociados a patrones, MAMPs) como la quitina de los hongos, peptidoglicano, la flagelina de bacterias y glucanos de la pared celular de oomycetes son detectadas específicamente por las células huésped y activan una respuesta (Bittel y Robatzek, 2007, Boller y Felix, 2009).

La inmunidad desencadenada por MAMP es ahora un campo fértil de investigación para la biología vegetal.

La respuesta hacia señales endógenas originadas a partir de estados de estrés o células lesionadas, el también llamado "regulación desde adentro", ahora está emergiendo como una función importante del sistema inmunológico. Las moléculas endógenas con actividad de inducción son liberadas de los componentes celulares durante el ataque patógeno o estrés abiótico, y ha estado indicado como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) en plantas (Boller y Felix, 2009; Galletti et al., 2009; De Lorenzo et al., 2011; Ranf et al., 2011) y animales, donde también se les ha llamado alarminas (Bianchi, 2007; Lotze et al., 2007). Los OGs son probablemente los mejores DAMPs caracterizados de plantas y provocan en varias especies de plantas una amplia gama de respuestas de defensa, incluida la acumulación de fitoalexinas (Davis et al., 1986), glucanasa, y quitinasa (Davis y Hahlbrock, 1987; Broekaert y Pneumas, 1988), deposición de callosa, producción de especies de oxígeno reactivo (ROS; Bellincampi et al., 2000; Galletti et al., 2008), y óxido nítrico (Rasul et al., 2012). Se piensa que los OG son liberados de las paredes celulares de las plantas tras la degradación parcial de HGA por PG microbianos durante las infecciones (Cervone et al., 1989) o por la acción de la PG endógena inducida por daño mecánico (Orozco-Cardenas y Ryan, 1999). La actividad de señalización de los OG es una clara indicación de que las plantas han desarrollado mecanismos para monitorear la degradación de HGA para la detección temprana de lesión tisular. La pectina es uno de los componentes más accesibles de la célula vegetal y, por tanto, está entre las principales estructuras en alterarse durante un intento invasivo patógeno o cuando la pared sufre una rotura por estrés (De Lorenzo y Ferrari, 2002). Siendo que la integridad de la pared celular de las plantas

puede ser vigilada de manera eficiente mediante el monitoreo del estado de la pectina, se ha propuesto la existencia de un sistema llamado "sistema de monitoreo de la integridad de la pectina" o SMIP, dedicado a esta función (De Lorenzo et al., 2011).

Es probable que los OGs estén ubicados en una posición clave en SMIP, de forma que les permita actuar como indicadores de la integridad de la pared celular, tanto en condiciones adversas y durante el crecimiento normal. Debido a que las enzimas degradantes de HGA, como de los OGs, están entre las primeras enzimas secretadas por los microorganismos durante la colonización del huésped, SMIP también incluye los inhibidores de las PG de hongos e insectos (PG-inhibiendo proteínas o PGIPs), que protegen la pared celular al limitar la degradación de HGA (De Lorenzo et al., 2001; De Lorenzo and Ferrari, 2002; Di Matteo et al., 2006).

Otros autores (Côté y Hahn, 1994) reportan que, como requisito estructural para la actividad biológica de los OGs, es necesario un grado de polimerización (GP) entre 10 y 15.

Un tamaño óptimo en los OGs favorece la formación de enlaces cruzados intermoleculares mediados por Ca^{2+} que dan como resultados estructuras llamadas "cajas de huevos" (Braccini y Perez, 2001; Cabrera et al., 2008), que se cree son necesarios para la actividad de OG.

La modificación del extremo reductor de los OG no afecta la formación de la caja de huevos (Cabrera et al., 2008) (resultados no publicados aún, obtenidos de laboratorio).

El HGA se sintetiza en forma esterificada en el aparato de Golgi y, posteriormente, se secreta en la pared celular donde sufre una desesterificación parcial por la acción de pectin metilesterasas (PME; Pelloux et al., 2007). El grado de esterificación de HGA varía en diferentes tejidos de acuerdo con la etapa específica del desarrollo (Wolf et al., 2009).

En la mayoría de los estudios, los OGs han sido preparados partiendo de ácido poligalacturónico digerido con PG comerciales (Nothnagel et al., 1983; Galletti et al., 2008; Cabrera et al., 2010), y aún no está claro cómo la esterificación afecta la actividad biológica.

La presencia de OGs con un bajo grado de metilación en frutos como la fresa que sobre expresan pectin metil esterasa (PME) se correlacionaron con la expresión de respuestas de defensa y con una resistencia parcial vinculada contra *Botrytis cinérea* (Osorio et al., 2008). Por otra parte, las plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobre expresan un inhibidor de PME o mutado a una PME endógena tiene un alto grado de esterificación (Lionetti et al., 2007, 2010; Raiola et al., 2010, 2011). Estas plantas no muestran expresión de respuestas defensivas, sin embargo, muestran una mayor resistencia a *Botrytis cinérea* y *Pectobacterium carotovorum*.

Hasta hace poco, los efectos de los OGs se estudiaron en plantas no modelo, tal como la soja (Hahn et al., 1981), por lo cual ha sido difícil identificar los componentes moleculares responsables de su percepción y transducción. Una limitación adicional de estos estudios fue que la producción y la acumulación de OGs es difícil de detectar *in vivo*, a menos que exista una degradación masiva del tejido, que generalmente ocurre únicamente durante las etapas posteriores de las infecciones de las plantas (An et al., 2005).

No se ha aclarado aún si las plantas son capaces de discriminar entre bajas fisiológicas y cantidades mayores de OGs producidos en situaciones patológicas (Aslam et al., 2009).

Comprender cómo es que funcionan los OGs es necesario para elucidar su papel *in vivo*, sin embargo, la identificación de un receptor de OG ha sido desalentador por mucho tiempo. Las quinasas asociadas a la pared

celular (QAP) fueron candidatos interesantes debido a su capacidad para atar OGs y ácido poligalacturónico (Anderson et al., 2001; Decreux y Messiaen, 2005).

La percepción de las moléculas no propias o provenientes de una señalización de daño es un mecanismo taxonómicamente extendido que puede tener un significado adaptativo. Existen paralelos sorprendentes entre pectina/OGs y fragmentos de hialuronano/hialuronano encontrados en células animales. La descomposición de hialuronano, un componente de la matriz extracelular animal, tras una lesión tisular o una infección patógena activa el sistema inmune innato vertebrado (Jiang et al., 2011).

3.8.3. OGs como reguladores de crecimiento y desarrollo en plantas.

Las interacciones dinámicas entre las células vegetales dependiendo del estado de la pectina en la pared celular están emergiendo como mecanismos regulatorios importantes de crecimiento y desarrollo (Wolf et al., 2012).

Debido a que la pectina se encuentra entre los primeros componentes que se modifican cuando la pared se somete a remodelación fisiológica, los OGs pueden ser importantes no solo en defensa contra patógenos, sino también en condiciones fisiológicas. Se ha informado que los OGs tienen efectos sobre el crecimiento y desarrollo en plantas. Uno de los primeros efectos descritos, fue la inducción de la maduración de la fruta de tomate a través de la inducción del etileno, posteriormente fue mediado por OGs con un grado de polimerización de 4-6 y no de 10-15 (Simpson et al., 1998).

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

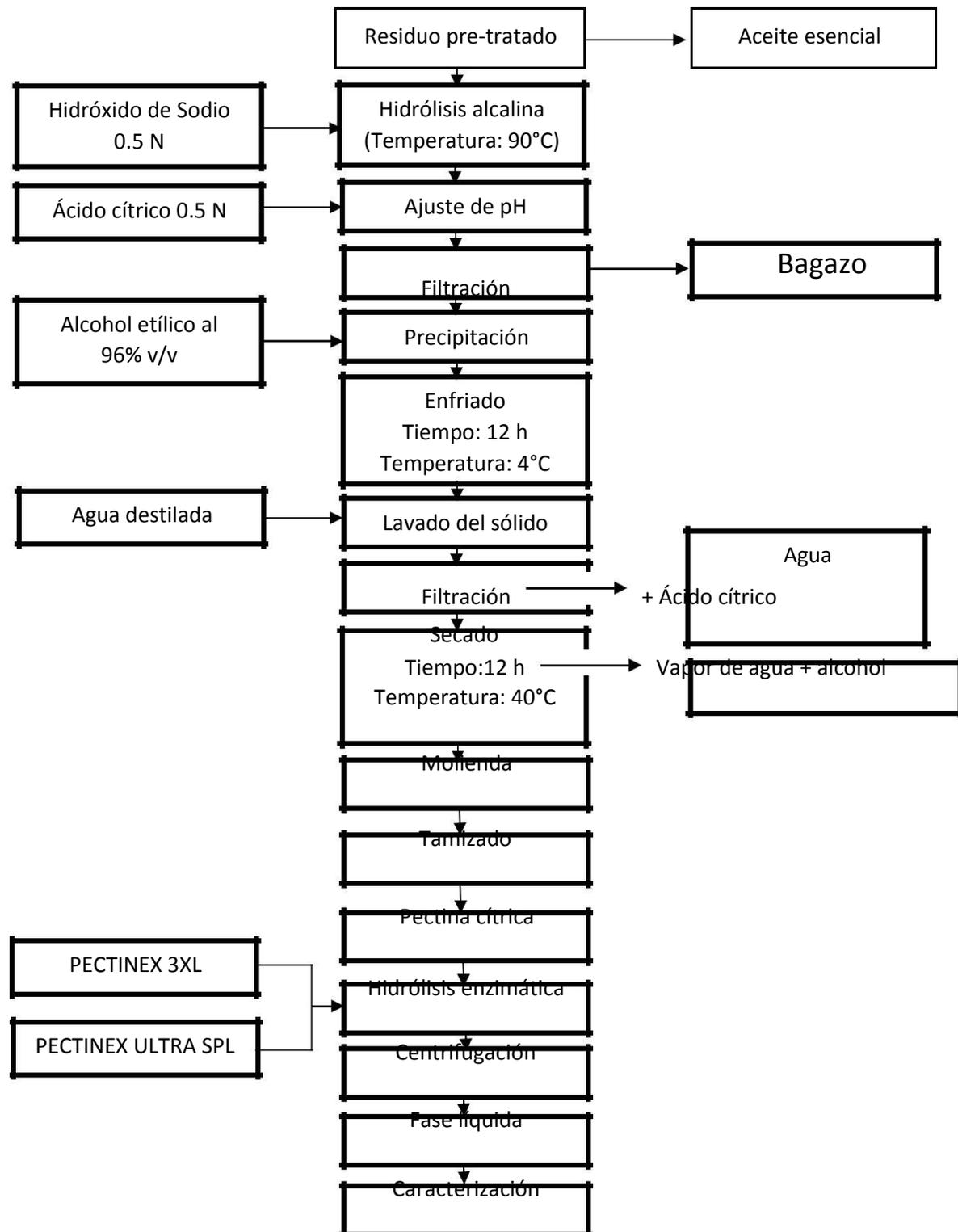


Figura 3. Diagrama experimental para la hidrólisis enzimática de pectina.

4.2. MATERIALES

- ⊗ Ácido cítrico 0.5 N.
- ⊗ Ácido clorhídrico 37%.
- ⊗ Ácido 3,5-dinitrosalicílico.
- ⊗ Ácido sulfúrico 95-98%.
- ⊗ Agitador magnético.
- ⊗ Agua destilada.
- ⊗ Albúmina sérica bovina "BSA".
- ⊗ Alcohol etílico 96% v/v.
- ⊗ Alcohol Butílico.
- ⊗ Alcohol Propílico.
- ⊗ Buffer de citratos 1M (21g ácido cítrico + 5.5 g NaOH + 75 mL agua destilada).
- ⊗ Carbazol 0.125% en etanol absoluto (almacenado a 4°C).
- ⊗ Fertilizante hidropónico de uso general.
- ⊗ Frascos de tapón de rosca con capacidad de 5mL.
- ⊗ Estándar de maltoheptosa marca SUPELCO[®].
- ⊗ Estándar de rafinosa marca SUPELCO[®].
- ⊗ Glicerol.
- ⊗ Hidróxido de Sodio 0.5 N.
- ⊗ Pectinex SPL marca Biotecsa S. A. de C.V.
- ⊗ Pectinex 3XL marca Novozymes[®].
- ⊗ Solución reveladora de KMnO₄.
- ⊗ Semillas de rábano "champion" (Raphanus sativus) Hortaflo[®].
- ⊗ Tela de cielo.
- ⊗ Tetraborato de sodio 0.025 M en ácido sulfúrico concentrado.

4.3. METODOLOGÍA

4.3.1. Materia prima.

Se empleó cáscara de toronja proveniente de Michoacán, la cual fue sometida a un proceso de extracción por arrastre de vapor para la obtención de aceite esencial en un reactor termomecanoquímico. El residuo obtenido de este proceso o pretratamiento fue a su vez materia prima para la posterior extracción de material péctico.

4.3.2. Obtención de Pectina.

La hidrólisis alcalina del residuo pre-tratado se realizó en un reactor termomecanoquímico acondicionado (Figura 1.) El suministro de NaOH 0.5N mantuvo un flujo de 7.8 Kg/h, mientras que el de ácido cítrico 0.5N fue de 4.5 Kg/h, a una temperatura de operación de 90 °C (Castro Aguilar, 2017).



Figura 4. Reactor termomecanoquímico.

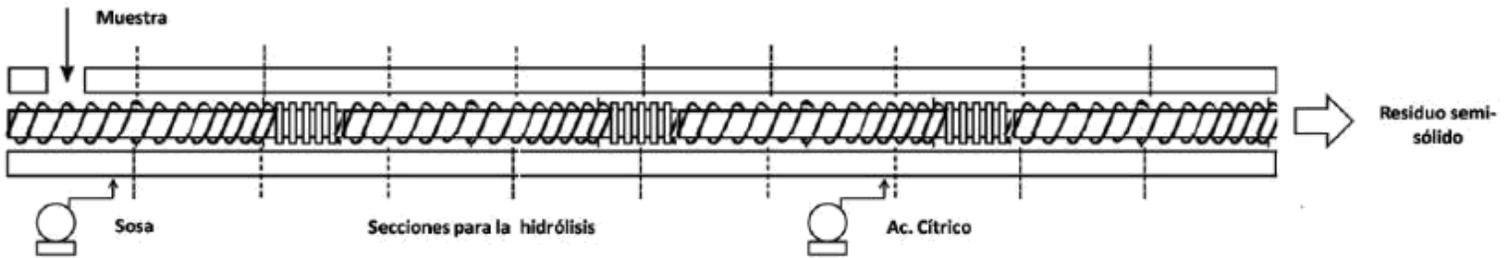


Figura 5. Esquema del doble husillo del reactor termomecanoquímico.

Posterior a la hidrólisis alcalina dentro del reactor se empleó ácido cítrico 0.5N para llevar la mezcla a un pH de 5, asegurando la posterior precipitación del material péctico añadiendo etanol al 96%. Mediante un filtro prensa se llevó a cabo la separación sólido-líquido de la mezcla, así como un secado parcial de la misma.

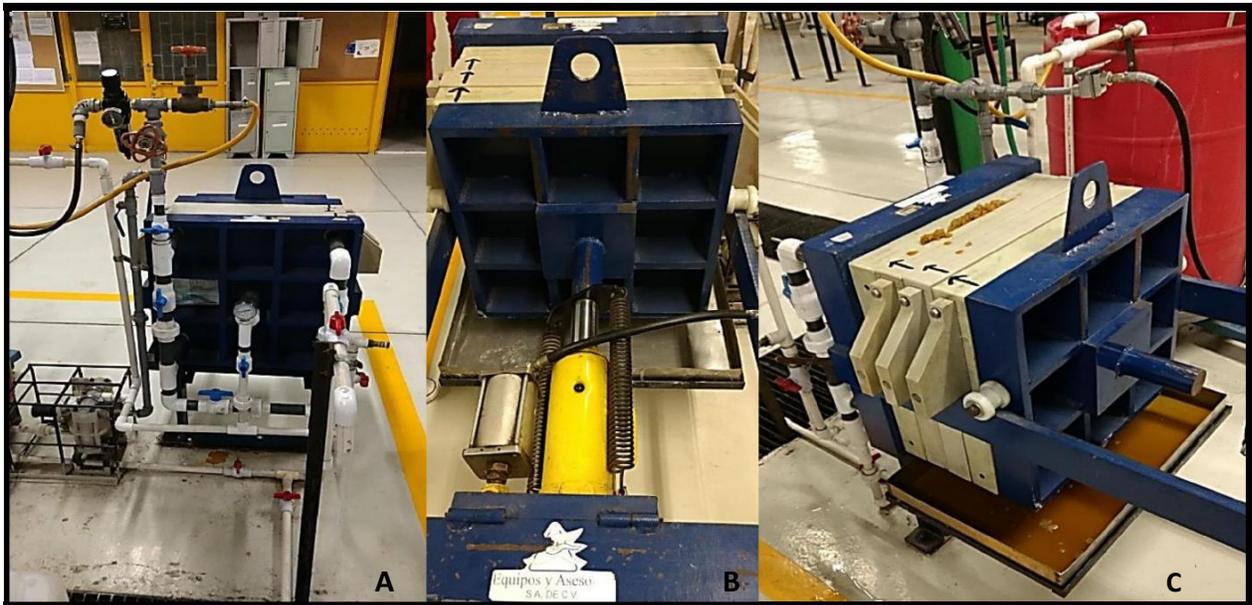




Figura 6. Filtro prensa empleado en el proceso de extracción de pectina.

- A.** Sistema de válvulas que componen el equipo.
- B.** Vista del gato hidráulico del equipo.
- C.** Vista del equipo en el proceso del filtrado.
- D.** Mezcla procedente del reactor a pH 5 antes de pasar por el filtro.
- E.** Fase sólida o torta depositada en las placas del equipo.



Figura 7. (I) Hojuelas de pectina después del proceso de secado.
(II) Pectina molida.

4.3.3. Hidrólisis de Pectina.

El diseño experimental se formuló con tres variables (temperatura, tiempo de reacción y carga de enzima) presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales de prueba para la hidrólisis enzimática.

Variables	Parámetro	PECTINEX ULTRA SPL	PECTINEX 3XL
	Temperatura (°C)	30 – 40 - 50	30 – 40 – 50
	Tiempo (min)	30 – 60 – 90	30 – 60 – 90
	Carga de enzima (µL)	12 – 25 - 50	12 – 25 - 50
Constantes	pH	4.5	4.5
	Concentración de sustrato (mg pectina/mL disolución tampón)	5	5
	Microorganismo	<i>Aspergillus aculeatus</i> ^(a)	<i>Aspergillus niger</i> ^(a)
	Enzima	Poligalacturonasa	Poligalacturonasa

(a) Fuente: SIGMA-ALDRICH[®], 2017.

Posteriormente, con el fin de optimizar la síntesis de oligogalacturónidos de peso molecular definido, DP3 a DP7, se varió la concentración de pectina y se añadió ácido galacturónico en diferentes concentraciones.

Tabla 2. Condiciones experimentales de prueba para optimizar la generación de OGs durante la hidrólisis enzimática.

	Parámetro	PECTINEX ULTRA SPL	PECTINEX 3XL
	Carga de enzima (µL)	5 – 38 – 75 - 100	5 – 38 – 75 - 100
	Concentración de sustrato (mg pectina/mL disolución tampón)	5 – 10 – 15 – 20 – 30 – 50	5 – 10 – 15 – 20 – 30 – 50
	Ácido Galacturónico (mg)	10 – 20 - 45	10 – 20 – 45

La hidrólisis enzimática en pectina para la generación de compuestos oligogalacturónidos es el método de obtención más utilizado, puesto que los oligogalacturónidos obtenidos no son expuestos a las condiciones

drásticas de la hidrólisis ácida que puede alterar su estructura (Coté & Hahn, 1994). Es por ello que se emplearon los cocteles enzimáticos siguientes:



Figura 8. (A) Pectinex Ultra SPL de Biotecsa.
(B) Pectinex 3XL de Novozymes.

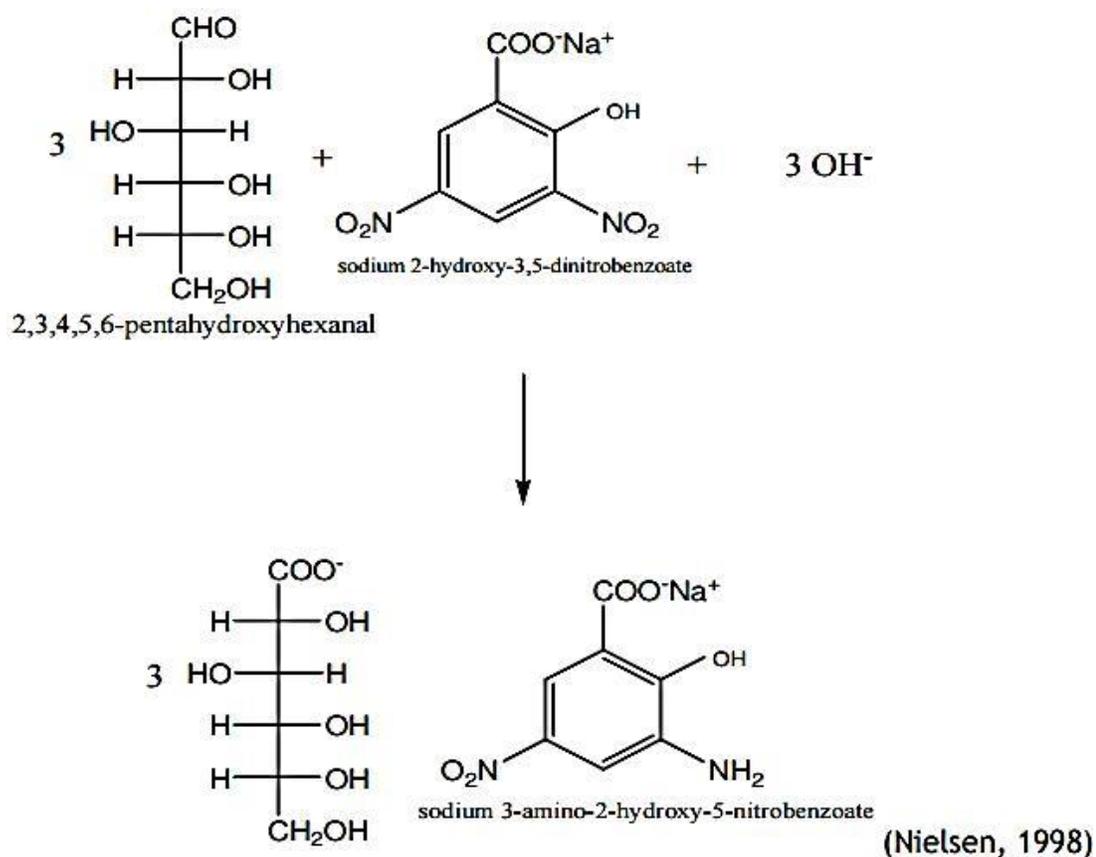
Tabla. 3 Actividad enzimática para los cocteles SPL y 3XL en función del AG producido en la reacción con carbazol.

Pectinex Ultra SPL	Concentración de proteína: 21.8 mg/mL
25 μ L – 40°C – 1 hora	8.61×10^{-6}
Pectinex 3XL	Concentración de proteína: 22.4 mg/mL
25 μ L – 40°C – 1 hora	2.27×10^{-5}

En la Tabla 3. se muestra la actividad de ambos cocteles empleando condiciones definidas para la obtención de ácido galacturónico de las gráficas 3, 4, 7 y 8 de la Figura 14.

4.3.4. Método ácido dinitrosalicílico (DNS).

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS para dar el producto monoamino correspondiente. Esta reacción da un producto colorido en solución alcalina. El procedimiento original de Dahlquist ha sido modificado en un proceso automatizado para análisis de azúcares totales producidos por la hidrólisis de polisacáridos que no contengan almidón. Para esto se requiere tener estándares similares a la muestra (Southgate, 1991). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Procedimiento.

Tomar 1 mL de la solución acuosa de la muestra, adicionar 1 mL del reactivo de DNS y calentar por 5 min en baño de agua hirviente, enfriar y diluir con 10 mL de agua destilada. Leer las absorbancias del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua tratado igual que la muestra. Cuantificar los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar preparada con el carbohidrato reductor de interés en concentraciones de 0.2 a 2 mg / mL (James, 1999).

4.3.5. Reacción con Carbazol.

Útil para cuantificar ácido galacturónico, glucurónico y otros. Basado en la reacción del carbazol con el producto de la deshidratación ácida de los ácidos urónicos, para formar complejos coloridos. La presencia de tetraborato incrementa la intensidad del color producido disminuyendo la interferencia del color producido por otros azúcares. Se pueden presentar interferencias por iones cloruro y diversas sustancias orgánicas con un color inespecífico (Nielsen, 1998).

Procedimiento.

Colocar en un tubo de ensaye 5 mL de disolución de tetraborato de sodio en H_2SO_4 conc. + 1 mL de solución problema. Mezclar y calentar en baño de agua hirviente por 10 min.

Añadir 0.2 mL de carbazol, agitar y dejar en el baño durante 5 min. más.

Dejar enfriar y leer en el espectrofotómetro a 530 nm ajustando previamente con un blanco.

La concentración se calcula a partir de una curva patrón realizada de la misma forma con ácido galacturónico en concentraciones de 4 a 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Nielsen, 1998).

4.3.6. Técnica de cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana (Sharapin, 2000).

La técnica de separación consta de un sistema de dos fases, una sólida (fase estacionaria) que se aplica en forma de capa delgada, absorbente, usualmente de entre 0.10 a 0.25 mm de grueso y en los casos que se desea aislar un compuesto el grosor puede variar entre 0.5-2.0 mm. Esta capa es fijada a una placa o lámina firme de vidrio, aluminio o plástico que actúa como soporte. A través de la fase estacionaria transita un líquido o solvente (fase móvil o eluyente) (Anderson, 2009).

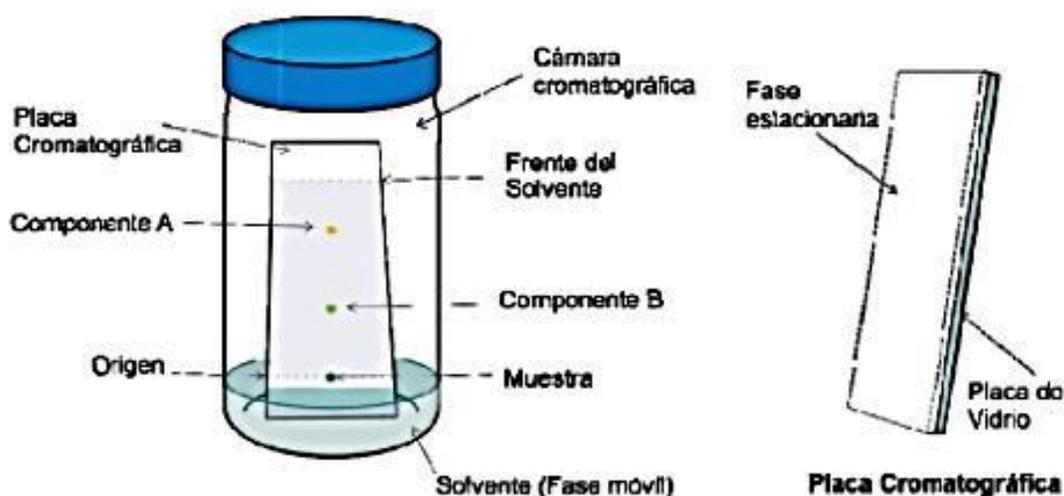


Figura 9. Montaje típico para cromatografía en capa fina: Cámara cromatográfica, placa cromatográfica, fase móvil y fase estacionaria.

*Fase móvil: Etanol – Propanol – Agua (5:3:1)

Procedimiento.

Tomar 0.5µL de la solución problema y aplicar una gota sobre la capa de sílica gel a 1 cm aproximadamente del borde inferior de la placa. Introducir la placa en una cámara de elución, que puede prepararse con un frasco de tamaño apropiado, colocar aproximadamente 4-5 mL de fase móvil cuidando que el nivel no sobrepase las marcas de aplicación y taparla.

Una vez que la placa esté dentro de la cámara, no debe moverse. Cuando el frente del eluyente esté casi en el borde superior de la capa de sílica gel, abrir el frasco, retirar la placa y marcar el frente del eluyente con un lápiz fino dejando secar al aire. Para visualizar las manchas, revelar con disolución de KMnO_4 (Romero, 2002).

4.3.7. Prueba de oligogalacturónidos en semillas de rábano.

Las semillas de rábano “champion” se sumergieron durante cuatro horas en las diferentes mezclas de oligogalacturónidos a una concentración de 10 mg/L, según el procedimiento empleado para otras hortalizas (Costales et al., 2007). La disolución se formuló de la premisa de que se conoce la concentración de pectina a hidrolizar y la concentración a la que se desea llegar, en este caso de 10 mg/mL. El mismo razonamiento se tomó para aquellas disoluciones que además de pectina contenían ácido galacturónico, en donde, la suma de concentraciones definió la concentración total presente en el medio a hidrolizar.

Además, se utilizaron dos controles: uno embebido en agua y otro sin imbibición. Una vez terminada la imbibición, las semillas se sembraron en

macetas de 1 L de capacidad, que contenían fertilizante de tipo hidropónico (FH) de uso general con la formulación siguiente:

Fórmula en partes por millón:

Nitrógeno: 203; Fósforo: 50; Potasio: 236; Calcio: 200; Magnesio: 48; Contiene, además, todos los microelementos necesarios.

1er experimento:

Se utilizaron 6 semillas por tratamiento, distribuyendo tres por cada maceta, dejándose crecer solamente dos plántulas con una separación de 7 cm entre ambas. Se realizaron riegos diarios a las macetas para asegurar una humedad continua en el medio.

Los lotes mantuvieron un riego continuo de 2 mL de OGs con concentración 10mg/L cada 4 días posterior a la germinación.

En este lote se evaluaron las plantas a los 30 días y en la cosecha. A cada una de las plantas se les separó la parte aérea de la raíz con un bisturí para su posterior evaluación de: altura y ancho del tallo, altura, ancho y peso del rábano sin la parte aérea.

Es importante mencionar que fue el único experimento que se dejó llegar al término de cosecha.

2do, 3er y 4to experimento:

Se utilizaron 6 semillas por tratamiento, distribuyendo tres por vaso, dejándose crecer solamente una plántula. Se realizaron riegos diarios para asegurar una humedad continua. Los lotes mantuvieron un riego continuo de 2 mL de Ogs con concentración 10mg/mL cada 4 días posterior a la germinación con la diferencia de que no todos contaron con fertilizante en el medio.

En estos lotes se evaluaron las plantas por un periodo de 1 mes a lo largo del cual se midió la longitud de los tallos generando una rapidez de crecimiento para cada oligo. Ésta es resultado de la medición de la longitud del tallo (cm) ubicada en el eje de las abscisas vs. el día en que se realizó dicha medición, ubicado en el eje de las ordenadas. Por lo tanto, la pendiente o rapidez tiene unidades de cm/día.

5to experimento:

Se utilizaron 6 semillas por tratamiento, distribuyendo tres por vaso, dejándose crecer solamente una plántula. Se realizaron riegos diarios para asegurar una humedad continua. Los lotes mantuvieron un riego continuo de 2 mL de OGs cada 4 días posterior a la germinación.

En este lote se evaluaron las mejores condiciones u OGs obtenidas de los pasados experimentos a diferentes concentraciones: 1x, 10x y 100x, correspondientes respectivamente a 10 mg/L, 100 mg/L y 1000 mg/L del oligo.

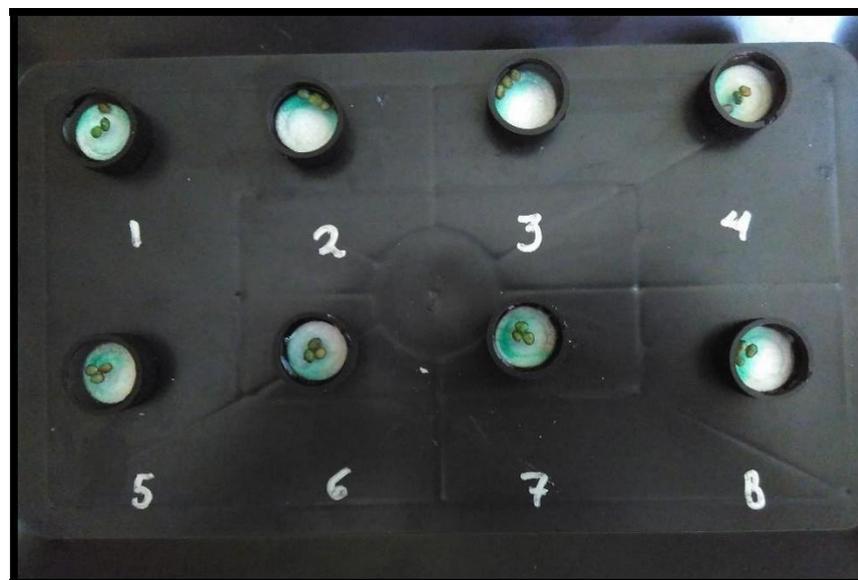


Figura 10. Semillas de rábano embebidas en oligogalacturónidos.



Figura 11. Plántulas a los 10 días de la germinación de las semillas (1er experimento).



Figura 12. Semillas de rábano el día de la siembra (2do experimento).

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones empleadas en el reactor termo-mecano-químico se fundamentan en un trabajo anterior al presente, en donde, se reportan altos rendimientos en la obtención de pectina, 24.64% base seca, empleando una concentración de NaOH de 0.5 N a 90°C (Castro Aguilar, 2017). Además, en estas condiciones el análisis por espectroscopía infrarroja arrojó resultados en donde existe ausencia de las bandas correspondientes a grupos esterificados (COOCH_3), presentando únicamente grupos carboxilos libres (COO^-).

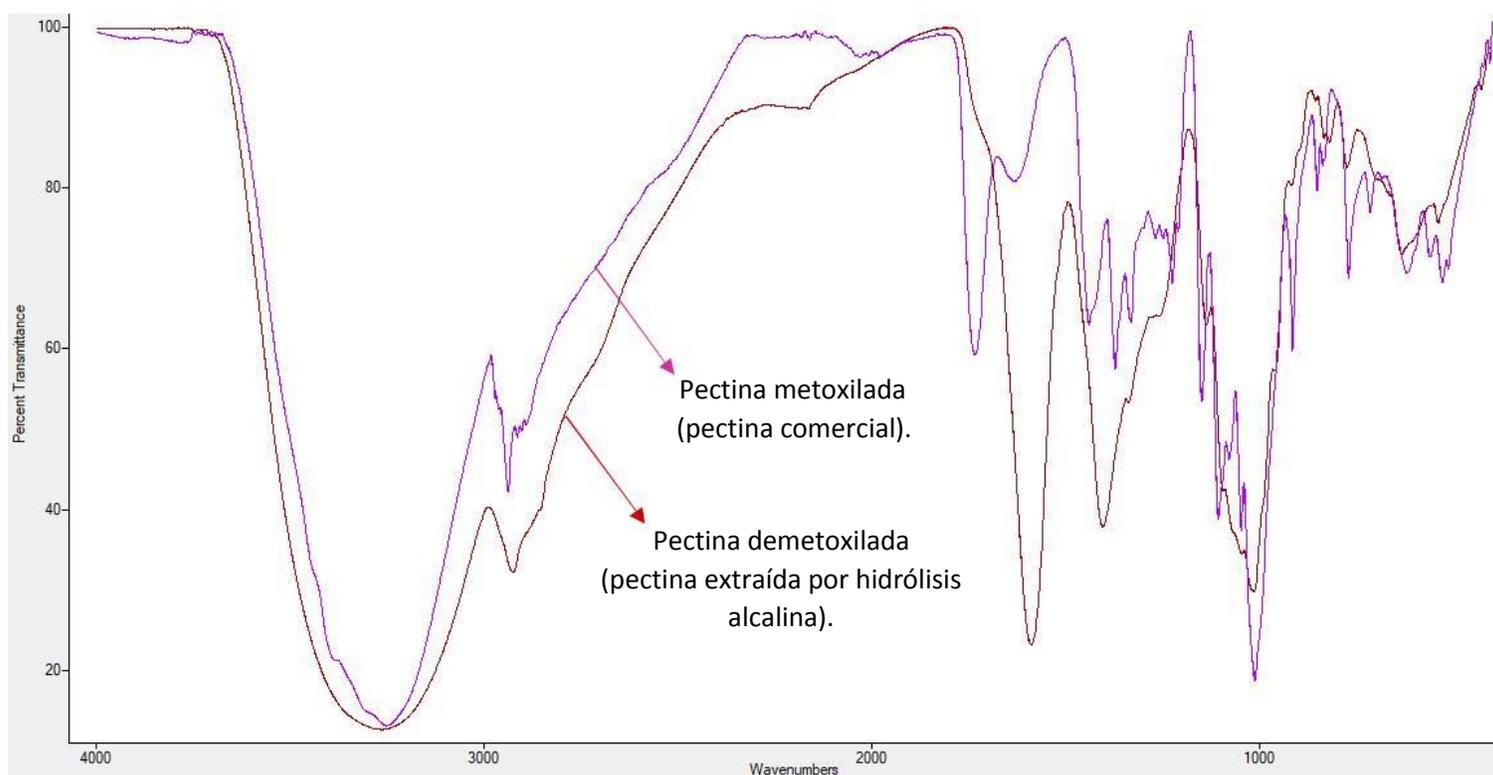


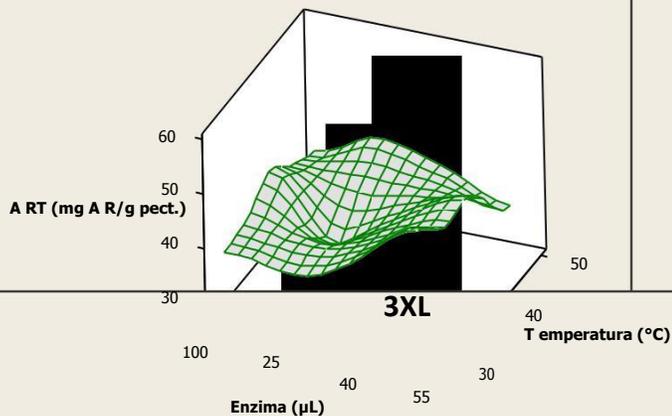
Figura 13. Espectro infrarrojo de pectina comercial y pectina extraída por hidrólisis alcalina (NaOH 0.5 N a 90°C).

La aplicación de hidrólisis básica utilizando hidróxido de sodio da lugar a la obtención de pectinas demetoxiladas (Thibault, 1993).

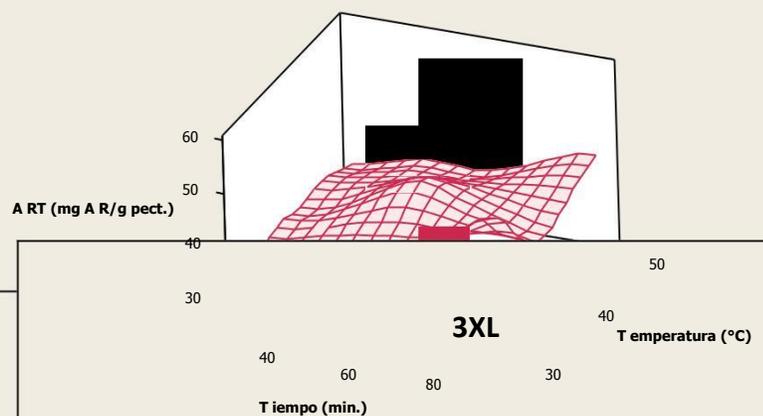
La demetoxilación previa de la pectina es un requisito indispensable para favorecer la acción de las enzimas endopoligalacturonasas, presentes en en PECTINEX 3XL, y así, obtener oligogalacturónidos libres de grupos metoxilos. Esto debido a que los oligogalacturónidos metoxilados no presentan actividad biológica (Cabrera, 2003).

Como se mencionó, el diseño experimental constó de tres variables (temperatura, tiempo, carga de enzima) mostrados en la Tabla 1. Primeramente, como variables de respuesta se cuantificaron: la concentración de azúcares reductores totales (Miller, 1959) y ácido galacturónico (Blumenkrantz, 1973) productos de la hidrólisis enzimática, con la finalidad de asociar con qué tratamiento existe la posibilidad de encontrar hidrólisis incompletas con un alto contenido de oligogalacturónidos. Los resultados de dichas determinaciones se presentan a continuación:

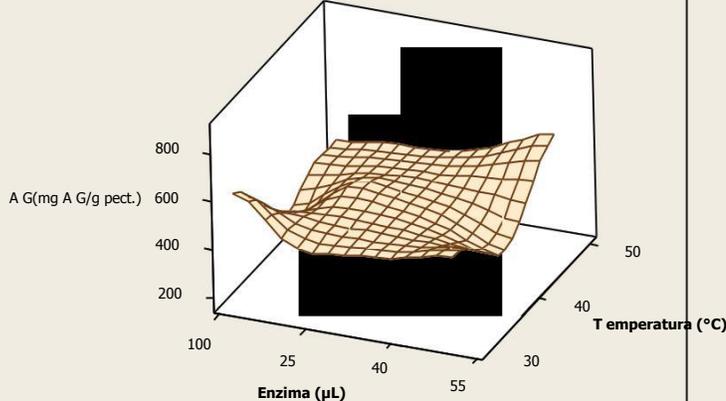
Gráfica de ART vs Temperatura, Enzima



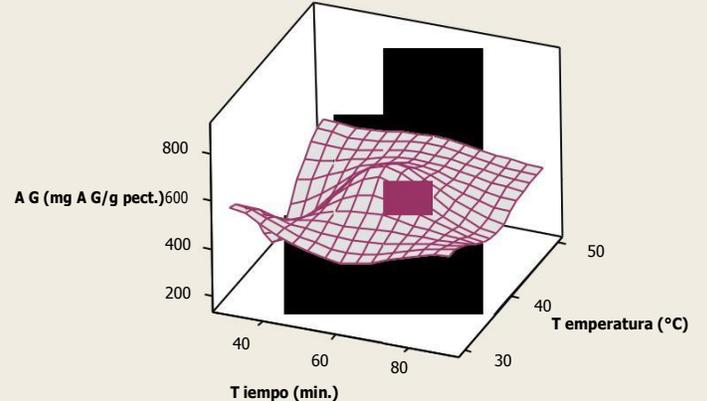
Gráfica de ART vs Temperatura, Tiempo



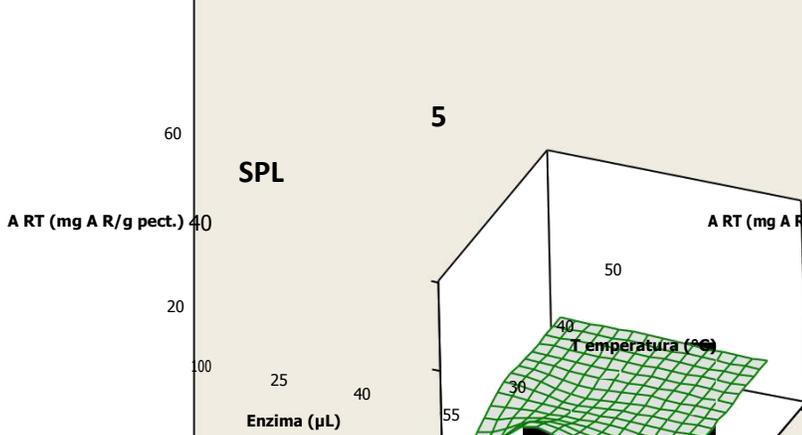
Gráfica de AG vs Temperatura, Enzima



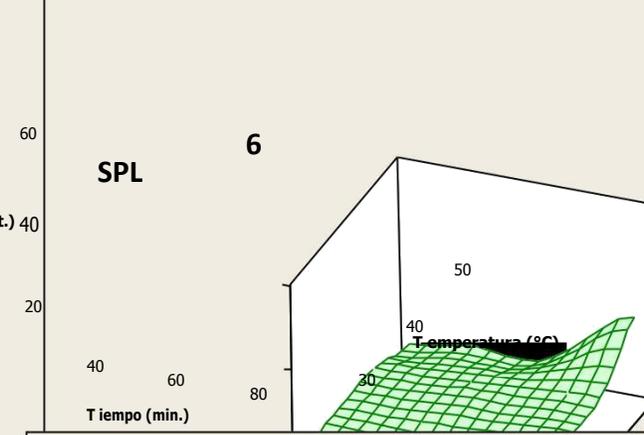
Gráfica de AG vs Temperatura, Tiempo



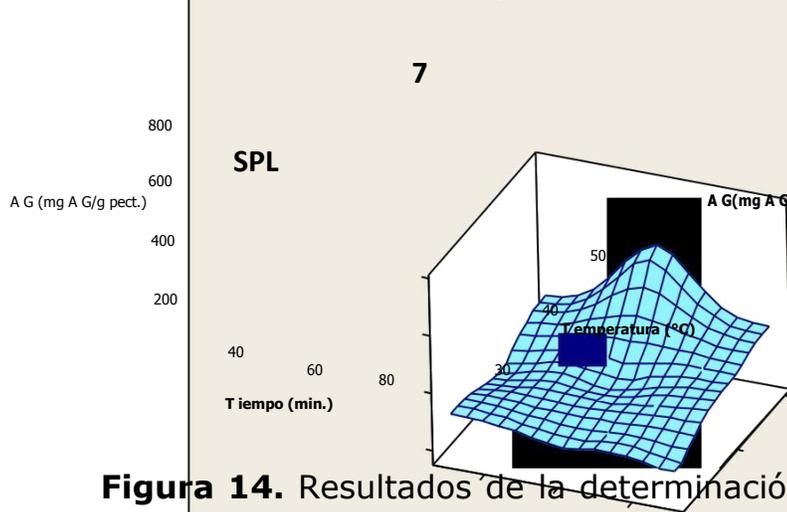
Gráfica de ART vs Temperatura, Enzima



Gráfica de ART vs Temperatura, Tiempo



Gráfica de AG vs Temperatura, Tiempo



Gráfica de AG vs Temperatura, Enzima

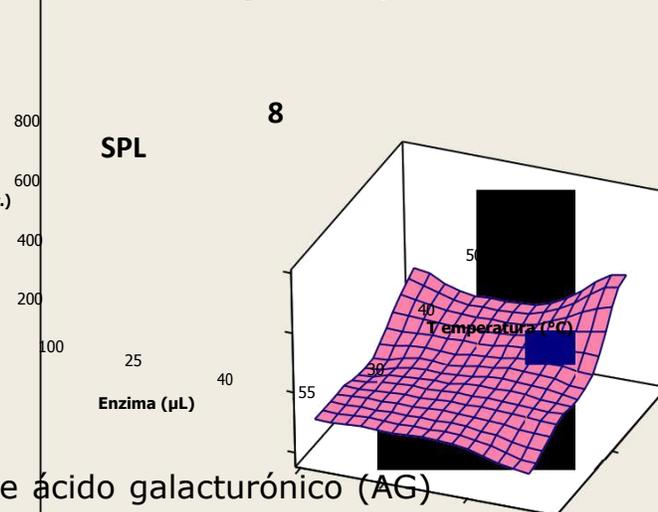


Figura 14. Resultados de la determinación de ácido galacturónico (AG) y de azúcares reductores totales (ART) para las enzimas: 3XL (1,2,3 y 4) y SPL (5, 6, 7 y 8).

Temperatura (30, 40 y 50 °C)

Enzima (12, 25 y 50 µL)

Tiempo (30, 60 y 90 min.)

En las gráficas presentadas (Véase Figura 14.) se observa que para la enzima SPL la mayor cantidad de ácido galacturónico obtenido en 27 corridas se presenta con una cantidad de enzima de 25 y 50 µL. En cambio, para la enzima 3XL los máximos se obtuvieron con 50 µL.

Con la variable temperatura, la mayor cantidad de azúcares reductores, así como de ácido galacturónico se presentó, para la enzima SPL, entre 30 y 40 °C, sin embargo, para la enzima 3XL, a los 40°C en las gráficas 1, 2, 3, y 4 de la Figura 13. se aprecian altas concentraciones para ambos productos ART y AG.

Respecto a la variable tiempo se registró un valor alto de AG y AR con la enzima 3XL a los 60 y 90 minutos, en cambio, para la enzima SPL se presentó a los 90 minutos.

Se han empleado diferentes procedimientos para definir el grado de polimerización de los oligosacáridos. Entre ellos, la cromatografía permite determinar el grado de polimerización de un oligogalacturónido tomando como base su posición relativa en un cromatograma, respecto a miembros conocidos de su serie homóloga.

Partiendo de las condiciones anteriores se realizaron 7 experimentos (OG1-OG7) con la finalidad de optimizar la síntesis de oligogalacturónidos de peso molecular definido, DP3 a DP7, para ello se varió la concentración de sustrato y cantidad de ácido galacturónico en las concentraciones que muestra la Tabla 2. Finalmente, en la Tabla 4. se muestran todas las variables involucradas en la síntesis con el propósito de identificar la longitud del oligo presente en cada mezcla de reacción mediante una cromatografía en capa fina, comparando sus factores de retención (Rf) con los de ácido galacturónico (AG), maltoheptosa (DP7) y rafinosa (DP3) con una pureza de 90%.

Tabla 4. Resultados de las mejores condiciones en cromatografía en capa fina.

Experimento	Enzima	Carga enzima	Tiempo	Temp.	Ac. Gal	Pectina	Rf
OG1	SPL	25 µL	60 min	40 °C	45 mg	20 mg/2mL	0.47
OG2	SPL	100 µL	60 min	50 °C	X	10 mg/2mL	0.56
OG3	SPL	38 µL	60 min	40 °C	X	10 mg/2mL	0.58
OG4	3XL	75 µL	60 min	40 °C	X	10 mg/2mL	0.59
OG5	SPL	25 µL	60 min	40 °C	10 mg	X	0.49
OG6	3XL	25 µL	60 min	40 °C	20 mg	X	0.52
OG7	3XL	25 µL	90 min	40 °C	45 mg	X	0.52
AG	CONTROL						0.88
DP3	CONTROL						0.62
DP7	CONTROL						0.44

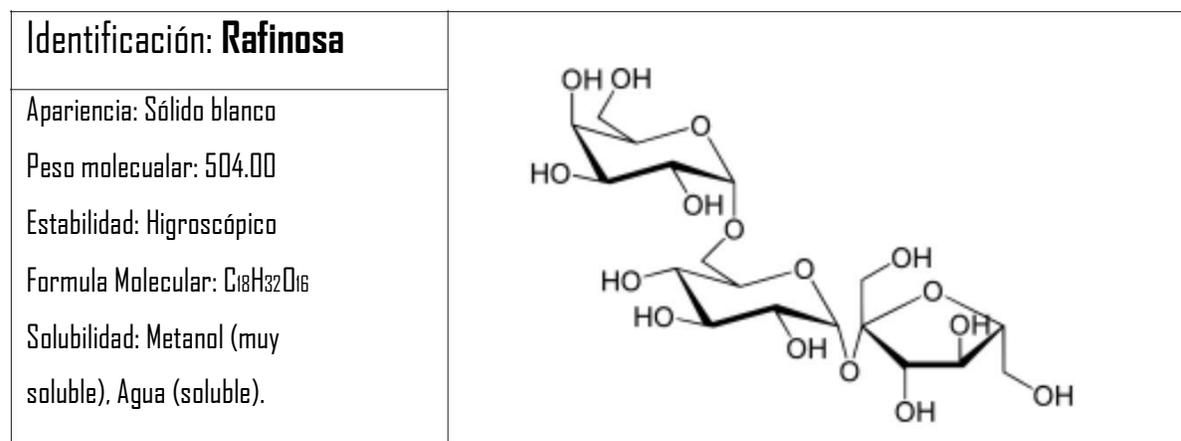
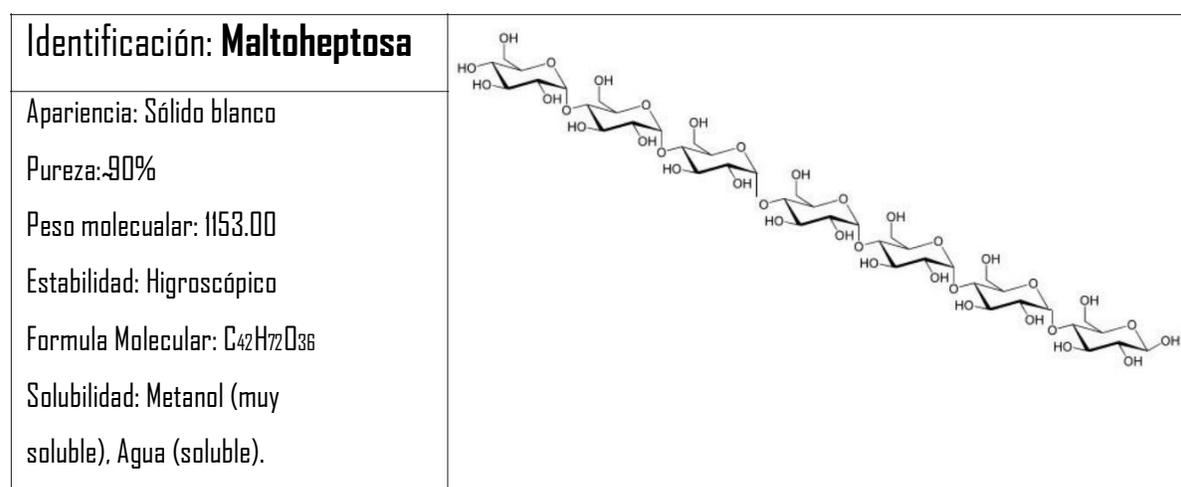


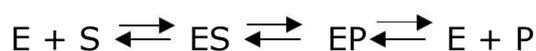
Figura 15. Estructuras de dos de los controles usados en cromatografía en capa fina.

El propósito de la adición de ácido galacturónico en el medio de reacción fue alterar el equilibrio regido por la ley de acción de masas, la cual enuncia que para una reacción reversible en equilibrio y a una temperatura constante, una relación determinada de concentraciones de reactivos y productos tiene un valor constante K (la constante de equilibrio) (Chang, 2010).

En todos estos casos la movilidad de los oligosacáridos es inversamente proporcional a su grado de polimerización. Las mejores condiciones en la obtención de compuestos de cadena cercana a un DP7 se encontraron a las condiciones subrayadas en amarillo de la Tabla 4., además de un menor grado de elución en aquellos experimentos que presentaban ambos compuestos, pectina y ácido galacturónico, y no sólo pectina, como inicialmente se realizó.

Este comportamiento se puede atribuir a una inhibición de la enzima por producto final, inhibición feed- back o retroinhibición (Nelson, 2005). Las enzimas no constituyen una excepción a la regla de que los catalizadores no modifican el equilibrio de reacción.

Se puede describir una reacción enzimática sencilla en la siguiente forma:



En donde E, S y P representan enzima, sustrato y producto, ES y EP son complejos transitorios de la enzima con el sustrato y con el producto, respectivamente. Las flechas bidireccionales ilustran que: cualquier enzima que catalice la reacción $S \rightarrow P$ también cataliza la reacción $P \rightarrow S$. La misión de la enzima es acelerar la interconversión de S y P. No se gasta enzima en el proceso y no queda afectado el punto de equilibrio (Lehninger, 1993).

Acorde a esto, se puede atribuir que los compuestos mayoritarios, resultado de las condiciones expuestas, son intermediarios de reacción favorecidos por la adición de un sustrato y un producto, en este caso, pectina y ácido galacturónico, respectivamente.



De manera general, en la mayoría de las muestras se observó una tendencia donde aquellas muestras que presentaron un valor de Rf más pequeño para cromatografía en capa fina presentaron también un alto contenido de ácidos galacturónicos libres en la reacción con carbazol.

Factores como el tiempo, rpm y la carga de enzima no tuvieron la misma influencia como la tuvo la concentración de sustrato (pectina), concentración de ácido galacturónico y la temperatura.

Posteriormente se procedió a evaluar las mejores condiciones (Véase Figura 14.) en semillas de rábano. El 1er experimento, como se mencionó con anterioridad, fue el único que se permitió llegar al término de la cosecha. Las evaluaciones se plantearon en función de la rapidez de crecimiento, es decir, de la longitud del inicio del tallo hasta el término de la hoja más alta, medida en centímetros, en un lapso definido medido en días.

Se realizó la comparación en la rapidez de crecimiento entre el 2do, 3er y 4to experimento, comparando a su vez estos datos con el primer experimento, en donde el parámetro a medir fue el peso promedio de los rábanos para cada oligo.

Es importante mencionar que a partir del 2do experimento se hizo una distinción entre aquellos experimentos que cuentan con el fertilizante

hidropónico (FH), para considerar si la presencia de éste en el medio pudiera ser un factor que pudiera mermar la acción de los OGs.

A continuación se muestran los resultados de las pruebas realizadas en semillas de rábano. Las condiciones de reacción y terminología usadas en las gráficas se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 5. Condiciones y definiciones para cada experimento. Parámetros a medir para las pruebas de oligogalacturónidos en semillas de rábano.

Experimento	Enzima	Carga enzima	Tiempo	Temp.	Ac. Galacturónico (Masa inicial)	Pectina (Conc. Inicial)
OG1	SPL	25 µL	60 min	40 °C	45 mg	20 mg/2mL
OG2	SPL	100 µL	60 min	50 °C	X	10 mg/2mL
OG3	SPL	38 µL	60 min	40 °C	X	10 mg/2mL
OG4	3XL	75 µL	60 min	40 °C	X	10 mg/2mL
OG5	SPL	25 µL	60 min	40 °C	10 mg	X
OG6	3XL	25 µL	60 min	40 °C	20 mg	X
OG7	3XL	25 µL	90 min	40 °C	45 mg	X
Control	CONTROL					
Control + FH	CONTROL + Fertilizante Hidropónico					
Rapidez de crecimiento	Conjunto de valores resultado de la medición de la altura del tallo, desde su base hasta la hoja más alta, contra el lapso durante el que se midió (cm/día).					

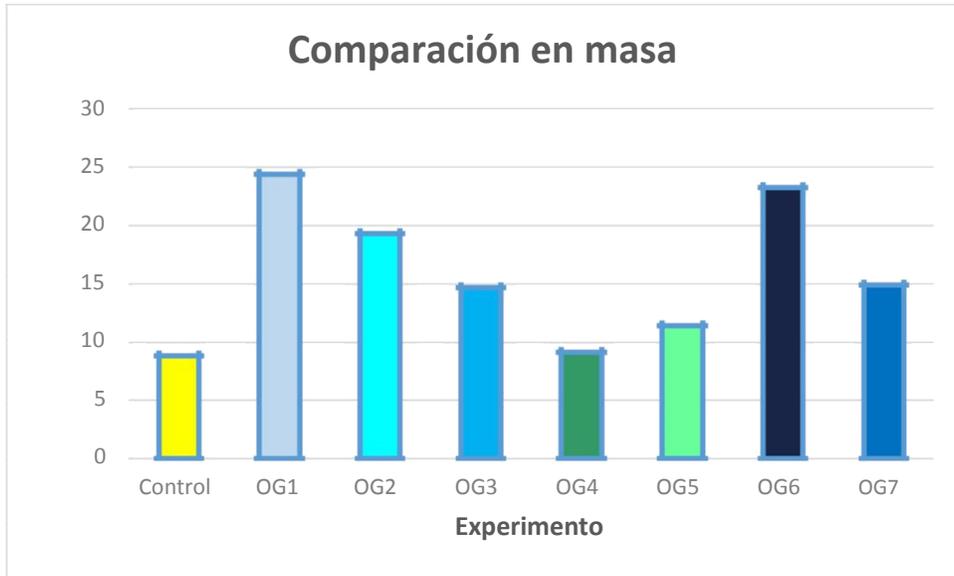


Figura 16. Gráfica comparativa de los diferentes OGs vs. el peso del rábano sin hojas en la cosecha – 1er experimento.

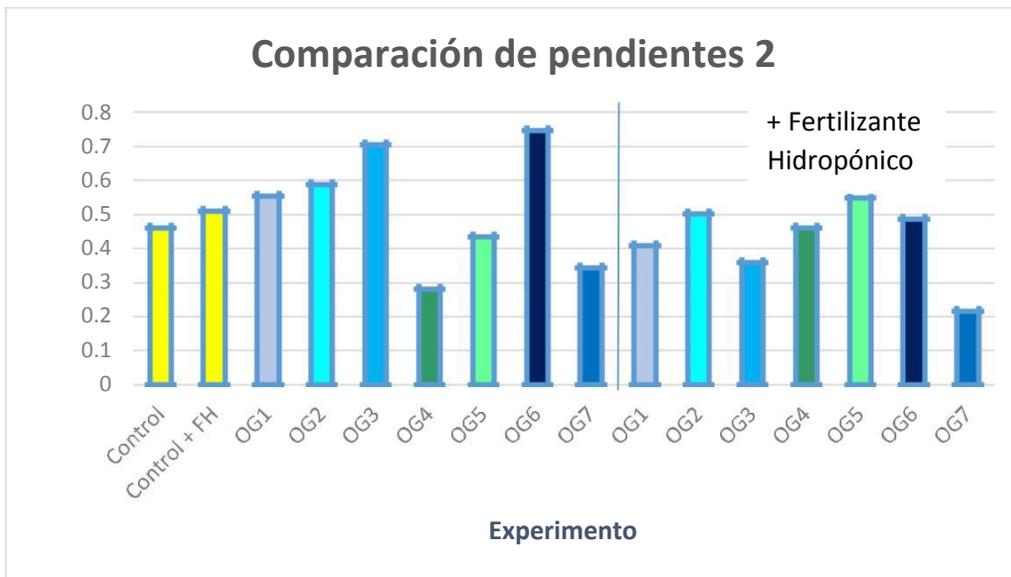


Figura 17. Gráfica comparativa de los diferentes OGs vs. la rapidez de crecimiento del tallo del rábano – 2do experimento.

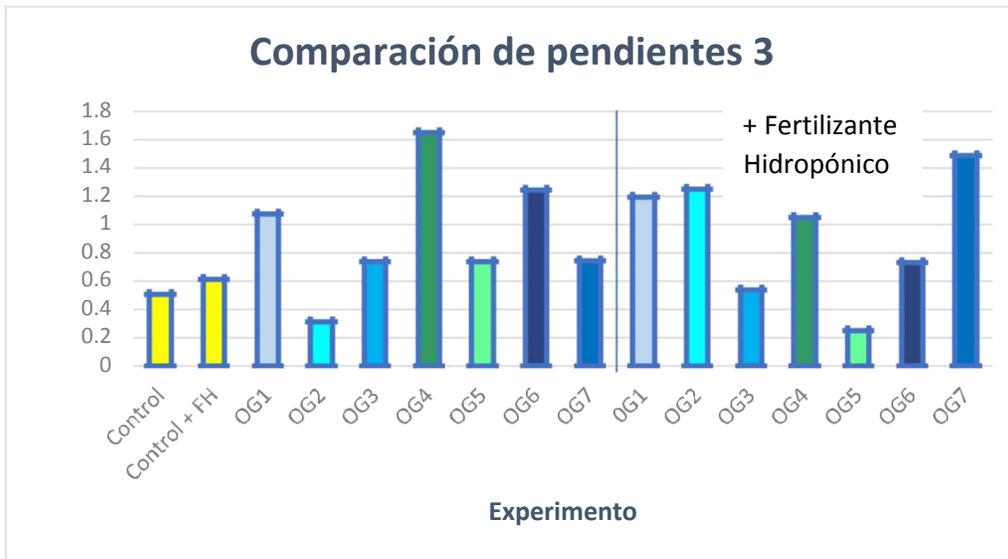


Figura 18. Gráfica comparativa de los diferentes OGs vs. la rapidez de crecimiento del tallo del rábano – 3er experimento.

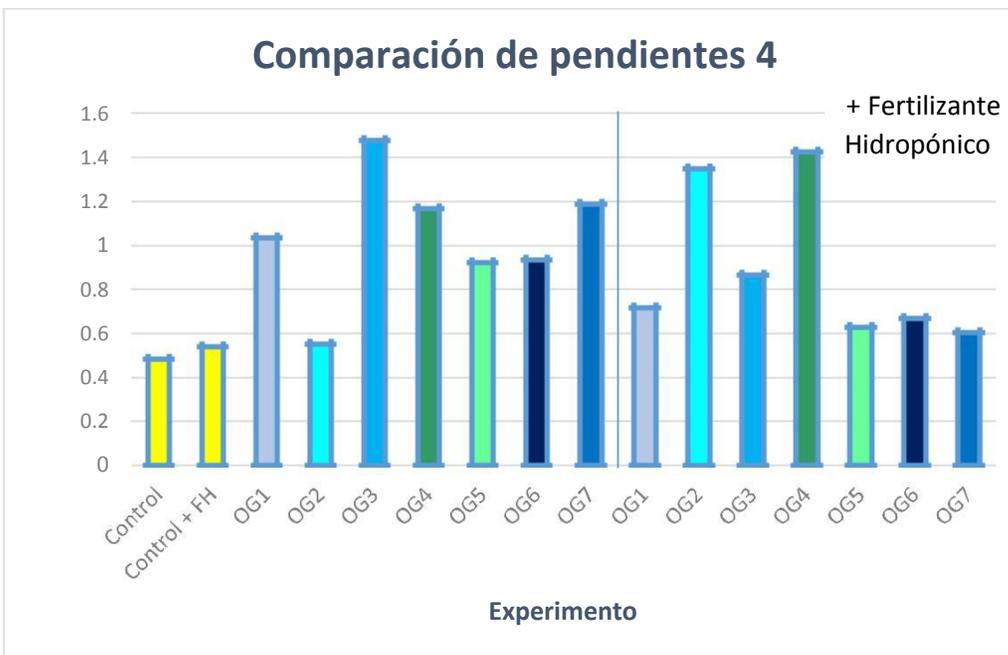


Figura 19. Gráfica comparativa de los diferentes OGs vs. la rapidez de crecimiento del tallo del rábano – 4to experimento.

De forma general, puede apreciarse en las Figuras 16 a 18, que aquellos que presentaron la adición del factor de crecimiento o fertilizante tuvieron una menor rapidez de crecimiento que aquellos en los que no se adicionó en el medio de siembra, por lo que podría esperarse que, de no haber adicionado el fertilizante en las macetas correspondientes al 1er experimento, los rábanos podrían presentar un peso mayor al reportado.

Uno de los problemas del cultivo del rábano es la asimilación de los nutrientes, por ser uno de los cultivos de ciclo corto (35 días aproximadamente), debido a que los fertilizantes químicos no se solubilizan rápidamente para que la planta absorba los nutrimentos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Gómez, 2011). Se puede atribuir la falta de crecimiento en los lotes con fertilizante a una competencia entre los nutrimentos provenientes del mismo contra los OGs aplicados.

Los 2do y 5to experimentos presentaron una menor cantidad de exposición al sol, realizados en los meses de agosto y noviembre, por lo que se puede observar que la diferencia en el crecimiento de los controles con respecto a los OGs de prueba no se presenta tan grande como las mostradas en el 3er y 4to experimento, realizados en los meses de septiembre y octubre.

Se observa además que los experimentos OG1 y OG6 se mantienen por arriba de los controles. Se puso especial atención en ambas condiciones pues los resultados obtenidos del 1er experimento (ver Figura 16.) y los análisis de cromatografía en capa fina (ver Tabla 4.) definieron a éstos con los mejores resultados.

Tomando en cuenta lo anterior se procedió a realizar un quinto experimento probando ambos OGs a diferentes concentraciones, con el

fin de averiguar si existe un mayor estímulo sobre las raíces de rábano, diferentes a los reportados en otros experimentos.

Los resultados se muestran en la Figura 20. donde para OG1 se observa que las concentraciones 1x y 100x presentan un buen crecimiento. No así se observa para OG6, donde la concentración de 10x presenta un buen resultado para ambos casos, ausencia o presencia del fertilizante en el medio. Es relevante mencionar además que este experimento se corrió en el mes de noviembre e inicios de diciembre, por lo que las temperaturas y exposición solar fueron menos favorables para los requerimientos de esta raíz en particular, por lo que sería necesario correr más pruebas para cerciorarse de que este factor de exposición a la luz solar no sea significativo con respecto a las diferentes concentraciones.

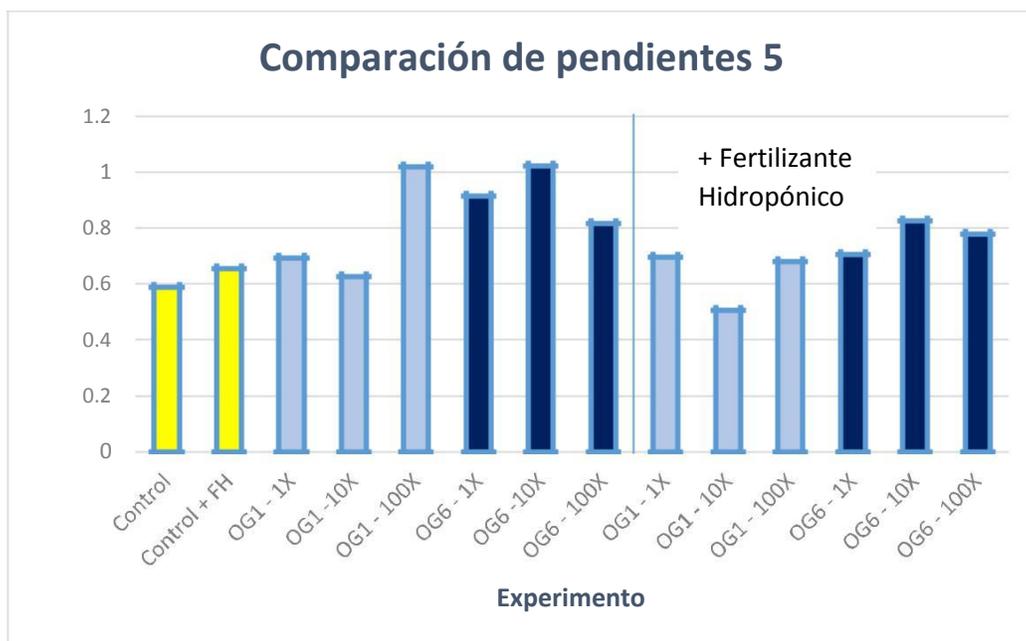


Figura 20. Gráfica comparativa de OGs con mejor tasa de crecimiento a diferentes concentraciones (1x, 10x y 100x) vs. la rapidez de crecimiento del tallo del rábano – 5to experimento.

Tomando como base los valores de Rf obtenidos de la cromatografía en capa fina (Véase Tabla 4.), se estima que OG1 y OG6 presenten un grado de polimerización entre 6 y 8 restos de ácido galacturónico, principalmente. Esto debido a que el valor del DP7 oscila en un Rf de 0.44, mientras que el DP3 se ubica con un valor de 0.62. OG1 y OG6 presentan valores de 0.47 y 0.52, respectivamente.

Se muestran a continuación fotos de las mejores condiciones obtenidas producto de esta investigación, correspondiente al 1er experimento. Cada lote de rábanos fue repartido en dos macetas, de forma que para cada experimento u oligo se generaron 4 rábanos de las mismas condiciones.



Figura 21. Rábanos OG1 en la cosecha – 1er experimento:

A. & C. Rábano pre y post cosecha de 1er maceta.

B. & D. Rábano pre y post cosecha de 2da maceta.



Figura 22. Rábanos OG6 en la cosecha – 1er experimento:

A. & C. Rábano pre y post cosecha de 1er maceta.

B. & D. Rábano pre y post cosecha de 2da maceta.



Figura 23. Rábanos Control en la cosecha:

A. & C. Rábano pre y post cosecha de 1er maceta.

B. & D. Rábano pre y post cosecha de 2da maceta.

Finalmente se realizó un análisis de varianza (Véanse Anexos) en donde se emplean los datos de las gráficas comparativas de las Figuras 16, 17 y 18. Las ANOVAS arrojan que, tomando en consideración los datos de estos tres experimentos existe diferencia significativa en las diferentes épocas del año, no así en los OGs, esto debido a que la dispersión entre los datos es muy grande, es decir, existe una diferencia importante entre los resultados obtenidos para las plantas de rábano que crecieron en los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre (Tabla 6.), definiendo así también que la adición de un fertilizante hidropónico no supone un efecto importante en el crecimiento de los rábanos.

Contemplando únicamente los datos de los OGs que no contienen fertilizante hidropónico (sólo el lado izquierdo las Figuras 16, 17 y 18) para los tres experimentos se encontró que de igual manera existe diferencia significativa entre los meses del año de la siembra, pero no así entre los OGs, la dispersión entre los datos continúa siendo grande porque existe un efecto importante por parte del clima (Tabla 7.)

En una tercer ANOVA se tomaron en cuenta únicamente los valores de las mejores condiciones obtenidas, OG1 y OG6, además de OG2 y OG3 que mostraron valores cercanos o similares a OG1 y OG6 para los tres experimentos, en donde se muestra que existe diferencia significativa entre los OGs, pero no así en la temporada del año en que se emplean, demostrando que sin importar la época del año en la que se emplee el OG tendrá el mismo efecto estimulante de crecimiento (Tabla 8.)

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Los oligogalacturónidos presentan gran actividad biológica, la cual está determinada por su grado de polimerización, por lo que pueden ser utilizados con fines agrícolas con el fin de aumentar los rendimientos, promover el enraizamiento y la micropropagación *in vitro* entre otros.

Comenzando con la obtención de pectina a partir de residuos de cáscara de toronja, haciendo uso de un reactor termomecanoquímico y filtro prensa, fue posible el estudio y generación de diferentes mezclas de oligogalacturónidos con un grado de polimerización que osciló de 3-8 residuos de ácido galacturónico, empleando un DP3 (504 UMA) y un DP7 (1152 UMA) como marcadores de peso molecular, proporcionando una importante actividad en semillas de rábano tipo "champion" con la premisa de que para su obtención es necesario crear un equilibrio entre la pectina y el ácido galacturónico durante el proceso de hidrólisis enzimática.

Aunque la presente investigación muestra el potencial del uso de estos compuestos en hortalizas, es necesario abordar a profundidad su uso en otras especies con la posibilidad de emplearlo como estimulador de crecimiento en otro tipo de cultivos.

CAPÍTULO VII.

REFERENCIAS

Alvarez, B., Reynaldo, E., Cartaya, R. & Terán, V. (2011). Efecto de una mezcla de oligogalacturónidos en la morfología de hortalizas de importancia económica. *Cultivos Tropicales*. 32 (3). 69-74.

Anderson, G. & Martinez, Y. (2009). Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. *ELIZCOM S.A.S.* Armenia, Colombia.

Barton, C. J.; Tailford, L. E.; Welchman, H.; Zhang, Z; Gilbert, H. J.; Dupree, P. y Goubet, F. (2006) Enzymatic fingerprinting of Arabidopsis pectic polysaccharides using polysaccharide analysis by carbohydrate gel electrophoresis (PACE). *Planta*, (224).

Baydoun, E. & Fry, S. (1985). The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta*. 165, 269–276.

Bishop, P., Pearce, G., Bryant, J. & Ryan, C. (1984). Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. Identify and activity of poly- and oligogalacturonide fragments. *J. Biol. Chem.* vol. 259, p. 13172-13177.

Bittel, P. & Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Plan Biol.* 10, 335-341.

Biz A, Farias FC., Motter FA., de Paula DH., Richard P. y Krieger N., (2014) Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works! *PLoS ONE*. 9(10).

Boller, T. & Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Plant Biol.* 60, 379-406.

Cabrera, J. C. (2003). Procedimiento de obtención de una mezcla de oligogalacturónidos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. Patente Cubana no. 22859.

Castro, A. (2017). Extracción del material péctico presente en residuos agroindustriales cítricos mediante un reactor termomecanoquímico. [Tesis de Licenciatura], Universidad Nacional Autónoma de México.

Chang, R. (2010) Química. *Mc Graw Hill*. 10 ed.

Chávez, G. M., y Aguilar, N. C. (2012). Aprovechamiento de la industria cítrica. *CIENCIACIERTA*, 8(29).

Cheong, J., Birberg, W., Fügedi, P., Pilotti, A., Garegg, P., Hong, N., Ogawa, T. & Hahn, M. (1991) Structure-Activity Relationship of Oligo- β -glucoside elicitors on Phytoalexin Accumulation in Soybean. *The Plant Cell*. 3, 127-136.

Combo, A., Aguedo, M., Quiévy, N., Danthine, S. & Goffin, D. (2012) Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 52 (1), 148-156.

Costales, D., Martínez, L. & Núñez, M. (2007). Efecto del tratamiento de semillas con una mezcla de oligogalacturónidos sobre el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*, 28(1), p. 85-91.

Coté, F. & Hahn, M. 1994. Oligosaccharins: Structure and signal transduction. *Plant Molecular Biology*. vol. 26, p.33.

EcuRed. PECTIMORF. 2017. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, [en línea]. Disponible en: <www.ecured.cu/Pectimorf>. [Último acceso el 6 de Marzo de 2017].

Falcón, AB. y Cabrera, J. C. (2007) Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturónidos en pecíolos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). *Cultivos Tropicales*. 28 (2). 87-90.

FAO. Citrus Fruit Statistics 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [en línea]. Disponible en: <www.fao.org/3/a-i5558e.pdf>. [Último acceso el 16 de Febrero de 2017].

FAO., 2002. *Los fertilizantes y su uso*. 4ta ed. Roma: IFA.

Favela, E., Volke, T. & Viniegra, G. 2006. Production of Hydrolytic depolymerising Pectinases. *Food Technology and Biotechnology*. vol. 44, no.2, p.8.

Federeci, L.; Caprani, C.; Mattei, B.; Savino, C.; Di Matteo, A.; Delorenzo, G.; Cervone, F. & Tsernoglou, D. (2001). Polygalacturonase for the interaction with PGIP endo structural requirements of (polygalacturonase-inhibiting protein). *PNAS*.

Fernández, B.; Rodríguez, R.; Guillen, R.; Jimenez, A. y Heredia, A. (1995) Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiol. Plant* vol.93, no.4, p. 651-658.

Fernando, S. (2003). Crecimiento de *Geotrichum klebahnii* y expresión de Protopectinasa-SE. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de la Plata.

Ferrari, S., Savatin, D., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F. & De Lorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in PLANT SCIENCE*. 4 (49).

Fogarty, W & Kelly, C. (1983). *Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science*.

García, P., Pérez, H. & García, D. (2010). Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología de la Cadena Agroalimentaria Toronja en el estado de Veracruz [en línea]. Disponible en: <<http://www.funprover.org/Estudios%20Estrategicos%20Ovinos,%20Toronja%20y%20Bovinos%20Doble%20Proposito%20Colpos%20Veracruz/CadAgroaTor.pdf>>. [Último acceso el 03 de Agosto de 2017].

Gómez, P. (2011). Evaluación del cultivo de rábano (*Raphanus sativus* L.) bajo diferentes condiciones de fertilización orgánica e inorgánica. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.

Goubet, F., Strom, A., Quéméner, B., et al. 2006. Resolution of the structural isomers of partially methylesterified oligogalacturonides by polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis. *Glycobiology*. vol. 16, no.1, p.7.

Gummadi, S., Manoj, N. & Kumar, S. 2006. Structural and biochemical properties of pectinases. *MacCabe, P.a.A.O.* (Ed). Industrial Enzymes. India:Springer. p.17.

Hahn, M., Darvill, A. & Albersheim, P. (1981). Host-pathogen interactions, XIX. The enogeneus elicitor, a fragment of a plant cell Wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulations in soybeans. *Plant Physiol.* 68, 1161-1169.

Hernández, G., Sepúlveda, B., Richards, A. (2006). The architecture of *Phaseolus vulgaris* root is altered when a defense response is elicited by an oligogalacturonide.

Brazilian Journal of Plant Physiology. 18 (2), 5.

Izquierdo, O. (2009) Los oligogalacturónidos de origen péctico y su acción en las plantas. *Temas de ciencia y Tecnología.* 13 (39). 31-40.

James, C. (1999). Analytical Chemistry of Foods. *ASPEN Publishers*. 2da ed. New York.

Kertesz, Z., Baker, G., Joseph, G., Motterm, H. & Olsen, A. (1944). *Chem. Eng. News*, 22 (105).

Lázaro, M. (2012). Preformulación y formulación de un gel reductor con extracto de toronja (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM

Lehninger, A. (1993) Principios de bioquímica. Barcelona: Omega. 2da. Ed.

Mederos, T. (2011). *Avances en la implementación del sistema de control de la calidad de mezclas de oligogalacturónidos* (tesis de maestría). Universidad de la Habana, Mayabeque, Cuba.

Mederos, Y. & Hormaza, J. (2008). Consideraciones generales en la obtención, caracterización e identificación de los oligogalacturónidos. *Cultivos Tropicales*. 29(1), p. 83-90.

Navarro, G. (2014). Sustancias pécticas y enzimas pecticos: Química y aplicaciones. *Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología*. Universidad de Murcia, España.

Negrillo, K., Ordóñez, R., Isla, M. & Sayago, J. (2005). Potencial aplicación de productos de la infección post-cosecha de frutas cítricas. *XXII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán*, Argentina.

Nelson, D. (2005). Lehninger principles of biochemistry. New York: Worth. 4ta Ed.

Nielsen, S. (1998). Food Analysis. *An Aspen Publication*. 2da ed. Gaithersburg: Maryland, USA.

Nothnagel, E., McNeil, M., Albersheim, P. & Dell, A. (1983). Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol.* 71, 916-926.

Patiño, A. (1998). Purificación y caracterización de una exopoligalacturonasa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.

Pospieszny, H. (1999) Potencial use of chitosan in plant protection. En: Chitin and Chitosan. Polish-Russian Monograph. P. 115.130.

Romero, G. (2002). Cromatografía, curso de métodos. *Instituto de Biotecnología, UNAM*.

Sharapin, N. (2000) Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos. *CYTED*, Colombia.

Sibise, I., Morales, D., Jiménez, E., Jiménez, M. & Morales, D. (2005). Evaluación de la acción de biomoléculas en el crecimiento de Tagasaste. Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal, Portugal.

SIGMA-ALDRICH[®] (2017). Pectinase from *Aspergillus aculeatus*. [en línea]. Disponible en:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2611?lang=es®ion=MX>.

SIGMA-ALDRICH[®] (2017). Pectinase from *Aspergillus niger*. [en línea]. Disponible en:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2736?lang=es®ion=MX>.

Simpon, S., Ashford, D., Harvey, D. & Bowles, D. (1998). Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the

gene encoding aminocyclopropae 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*, 8(6), p. 579-583.

Southgate, D. (1991) Determination of Food Carbohydrates. *Elsevier Applied Science*. 2da ed. Nueva York, USA.

Spiro, M., Bowers, J. & Cosgrove, D. 2002. Comparison of oligogalacturonide and auxin induced extracellular alkalinization and growth responses in roots of intact cucumber seedlings. *Plant Physiology*. vol. 130, p.14.

Spiro, M., Ridley, B., Eberhard, S., Kates, K., Mathieu, Y., O'Neill, M., Mohnen, D., Guem, J., Darvill, A. & Albersheim, P. (1998). Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue Cultures. *Plant Physiology*. vol. 116, p. 1289-1298.

Thibault, J. 1993. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acids hidrolisis. *Carbohydrate Research*.. vol. 238, p.16.

Voragen, A.; Pilnik, W.; Thibault, J.; Axelos, M. & Renard, C. (1995). Food polysaccharides and their applications. *Marcel Dekker*, p. 287-339.

Wilkins, R., Widmer, W., Grohmann, K. y Cameron, G. (2007). Hydrolisis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource technology*, 98, 1596-1601.

Zhang, J. & Zhou, J. (2010). Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant*. 3(5), 783-793.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

8.1. ANÁLISIS DE VARIANZAS (ANOVA).

Durante el desarrollo del presente trabajo se llevaron a cabo un análisis de varianza en tres estudios. A continuación, se presentan las tablas obtenidas, considerando en todos los casos $\alpha=0.05$.

Tabla 6. ANOVA empleando la rapidez de crecimiento como variable de respuesta y al tipo de OG y temporal como fuentes de variación.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Tipo de OG	0.935	7	0.134	1.34	0.260
Temporal	1.955	5	0.391	3.93	0.006
Error	3.480	35	0.099		
Total	6.370	47			

$\alpha < P$; se acepta H_0 (No existe diferencia significativa entre los tipos de OGs a los que se les adicionó fertilizante hidropónico de los que no, con una confiabilidad del 95%).

$\alpha > P$; se rechaza H_1 (Existe diferencia significativa entre la época del año en la que el OG es sembrado, con una confiabilidad del 95%).

Tabla 7. ANOVA empleando la rapidez de crecimiento como variable de respuesta y al tipo de OG y temporal como fuente de variación.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Tipo de OG	1.007	7	0.144	1.60	0.214
Temporal	0.911	2	0.455	5.07	0.022
Error	1.257	14	0.089		
Total	3.174	23			

$\alpha < P$; se acepta H_0 (No existe diferencia significativa entre los tipos de OGs que no se les adicionó fertilizante hidropónico, con una confiabilidad del 95%).

$\alpha > P$; se rechaza H_1 (Existe diferencia significativa entre la época del año en la que el OG es sembrado, con una confiabilidad del 95%).

Tabla 8. ANOVA empleando la rapidez de crecimiento como variable de respuesta y al tipo de OG y temporal como fuente de variación.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Tipo de OG	0.899	5	0.179	3.2	0.05
Temporal	0.177	2	0.088	1.6	0.254
Error	0.562	10	0.056		
Total	1.638	17			

$\alpha < P$; se rechaza H_0 (Existe diferencia significativa entre OG1, OG2, OG3 y OG6, con una confiabilidad del 95%).

$\alpha > P$; se acepta H_1 (Existe diferencia significativa entre la época del año en la que el OG es sembrado, con una confiabilidad del 95%).

8.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

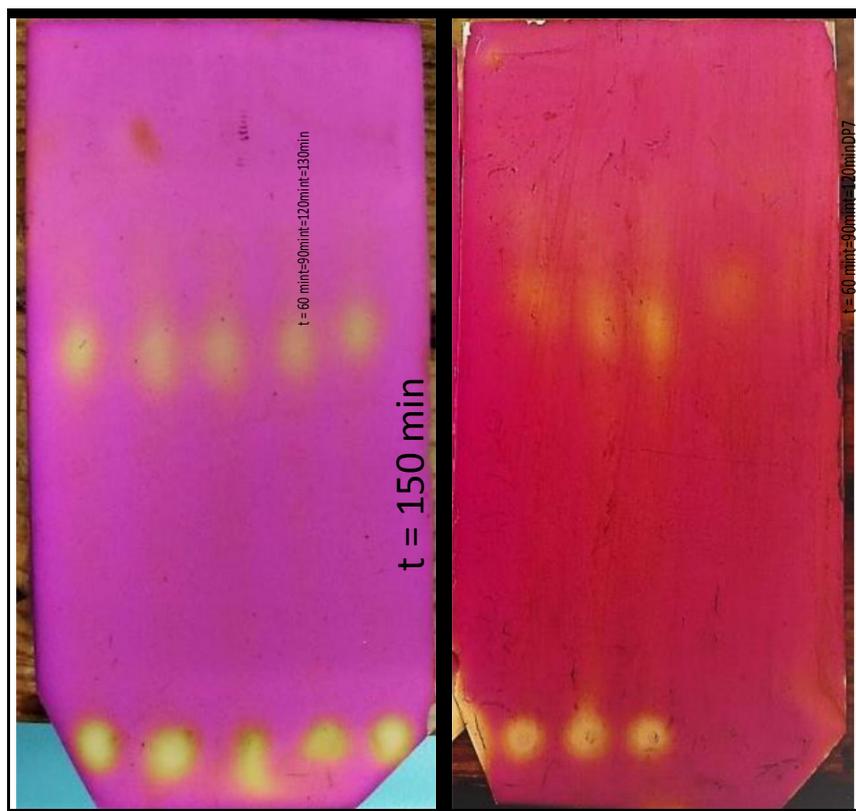


Figura 24. Cromatografía en capa fina para OG1.