



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Efecto del envejecimiento acelerado sobre los
veles de ácidos grasos insaturados de semillas de
Pachycereus hollianus.”**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta

Manuell Cacheux Irma Estrella Beatriz

Director de Tesis: Dr. Flores Ortíz Cesar Mateo

**Los Reyes Iztacala, Estado de México.
Mayo de 2006**





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICADA A:

MI FAMILIA.

Mi mamá, por permitirme nacer y estar en este mundo. Nunca encontraré la forma de agradecerte tantas cosas, por estar ahí cuando te necesité y por que no, también cuando no lo estuviste. Pero sobre todo por creer en mí todo este tiempo, en el que ni yo misma creía en mí para terminar varias cosas. Hoy y siempre serás mi ejemplo a seguir para no desistir nunca.

A mi padre, pues estoy consciente de que siempre se puede aprender algo de alguien, cosas buenas y malas, pero todo es aprendizaje; sólo hay que saber con qué quedarse. Aún, en los momentos más difíciles de nuestra vida algo se aprende.

A mis hermanas Gela, Ivonne e Hilda; por soportar mis neuras y mi mal genio, y siempre estar con migo, aunque nos peleemos y terminemos mandándonos muy lejos, gracias por todo su apoyo..... y por hacer que mi vida tenga sentido.

A mi cuñado Mauricio y mis sobrinos, Gerardo y Mauricio, por su apoyo y cariño; los quiero mucho.

A mi hermano Ricardo, por todo su apoyo y comprensión, y por estar con migo siempre que lo he necesitado, por saber escuchar y al mismo tiempo saber callar en los momentos precisos; por ser en mi vida mi aliciente eterno y mi ejemplo a seguir.

A mi hermano Rodrigo, que aunque no estuviste físicamente con migo en un buen tiempo, siempre estuviste en mis pensamientos y en mi corazón.

A mi amiguísima del alma, mi casi hermana Marú, por todo este tiempo de compartir momentos buenos y malos con migo, y porque sé que nada ni nadie podría acabar con nuestra amistad.

Y a tí Cesar, por todo lo vivido en estos años juntos; por tu apoyo, tus neuras, tus rollos, tus conocimientos, tu comprensión y sobre todo, por ser como eres. TQM.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César Mateo Flores Ortíz, por compartir con migo su escaso tiempo, sus conocimientos, y no sólo los académicos; por ser como él dice: “una finísima persona”, y por toda la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

Al Biol. Luís Barbo Hernández Portilla por todo el tiempo dedicado para enseñarme y asesorarme durante la realización de este trabajo, recibe mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Ignacio Peñalosa Castro por sus conocimientos, ideas y prontas correcciones a mi tesis, para que fuera un mejor trabajo, gracias.

Al M en C Ernesto Aguirre León por su amabilidad y sencillez que lo caracteriza y por sus buenas observaciones a mi trabajo.

A la M en C Antonia Trujillo Hernández por sus observaciones tan acertadas y sus buenas preguntas e ideas para el mejoramiento de mi trabajo, gracias maestra.

A la M en C Josefina Vázquez Medrano por todo su apoyo y por estar siempre dispuesta a ayudar, sin esperar nada a cambio.

Al Biol. Rafael Quintanar Zúñiga por ser como es, con su peculiar sentido del humor.

A la M en C Martha Urzúa Meza y a la Biol. Margarita Moreno por estar siempre al pendiente de lo que faltaba, por su apoyo y amistad.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, con número de proyecto IN201405, por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A todos los buenos profesores de la carrera de Biología de la honorable FES Iztacala, pues sin sus conocimientos sería difícil llegar a momentos como este.

A todos mis compañeros de la carrera y son tantos que tendría que hacer otra tesis, sólo para mencionarlos así que sólo les diré, ¡ya hice la oficial! y con esta es más que suficiente por ahora, sale? Pero sepan que cada uno de ustedes contribuyó a que yo llegara hasta aquí.

INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Las cactáceas	3
El papel de las cactáceas en México.	5
Tipos de semillas	7
El proceso de envejecimiento en semillas	8
La formación de radicales libres	9
Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados	11
Indices de peroxidación lipídica en semillas	12
Espectroscopía de Reflectancia en Infrarrojo Cercano (ERIC o NIRS)	13
Los análisis quimiométricos.	14
ANTECEDENTES	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	
Objetivo General	17
Objetivos Particulares	17
DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO	18
Características de la especie.	19
MATERIAL Y MÉTODOS	
Características del sitio de muestreo y muestreos	21
Tratamientos pregerminativos	21
Determinación de la viabilidad de semillas, por porcentaje de germinación.	21
Tratamientos de envejecimiento acelerado.	22
Extracción y transesterificación de ácidos grasos de semillas	22
Análisis de ácidos grasos por GC-MS	23
Registro del espectro de infrarrojo de semillas mediante NIRS	23
Modelo mediante el Quimiométrico (QUANT).	24
Análisis estadísticos	24

RESULTADOS

Tratamientos pregerminativos -----	25
Envejecimiento acelerado -----	26
Transesterificación de los ácidos grasos. -----	27
NIRS y Quimiométrico -----	29
Germinación real contra la estimada mediante NIRS -----	30
Contenido de ácidos grasos contra el estimado por NIRS -----	31
Germinación vs ácidos grasos de semillas -----	33
DISCUSIÓN -----	35
CONCLUSIONES -----	41
LITERATURA CITADA -----	42
APÉNDICE “A” -----	49
APÉNDICE “B” -----	51
APÉNDICE “C” -----	54

RESUMEN

Las semillas, durante su almacenamiento en los bancos, experimentan un proceso de deterioro o envejecimiento, que se manifiesta con una reducción en la capacidad de germinación. Este proceso es asociado a la peroxidación lipídica de la membrana de las células del embrión. Por eso los objetivos de este trabajo fueron, establecer las condiciones de germinación, inducir a las semillas de *Pachycereus hollianus* al envejecimiento acelerado bajo diferentes condiciones, y correlacionar los niveles de ácidos grasos saturados e insaturados con las diferentes respuestas en la germinación, durante el proceso de envejecimiento acelerado. Para ello se colocaron semillas de *P. hollianus* en condiciones de 55%, 65% y 75% de humedad relativa y temperaturas de 45 y 55°C para cada humedad relativa, separando una muestra cada tercer día para los análisis de germinación, niveles de ácidos grasos y espectros de infrarrojo, para correlacionar todos estos parámetros con el envejecimiento acelerado de las semillas mediante el programa QUANT Plus. En los resultados de germinación se encontró que la mejor forma de romper la quiescencia de estas semillas, es con 24 hrs. de hidratación y aereación continua; obteniéndose germinaciones del 100%. Al final del tratamiento de envejecimiento (15 días), la germinación disminuyó a 75.5% para la combinación de 55%RH 45°C, a 79% en 65%RH 45°C y a 43% en 75%RH 45°C y para las combinaciones de mayor temperatura: a 7.5% para 55%RH 55°C, a 5% en 65%RH 55°C y a 2.5% en 75%RH 55°C. Así mismo, se observó que en general los ácidos grasos insaturados y uno de los saturados disminuyeron, manteniéndose constante el palmítico. Los coeficientes de correlación obtenidos mediante el modelo químimétrico fueron de 99.8% para la germinación, 96.6% para el ácido linoleico, 64.6% para el oleico, 91.1% para esteárico y no se obtuvo correlación para el palmítico. Estos coeficientes son aceptables para nuestro modelo de predicción. Por lo tanto, se concluye: 1) la humedad relativa es un factor determinante en la inducción del envejecimiento acelerado, 2) existe una sinergia entre temperatura y humedad relativa elevadas, 3) que el método descrito es confiable en predicciones a futuro para semillas de *Pachycereus hollianus*. Y por último, 4) la técnica de NIRS ofrece una correlación altamente significativa de las condiciones en las que se encuentran las semillas sin que éstas sean destruidas o se les cause algún daño.

INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son cruciales en la estabilidad de los ecosistemas de las regiones áridas y semiáridas, ya que con sus raíces mantienen la cohesión de los suelos, evitando la pérdida de los mismos; es por ello, necesario investigar y desarrollar tecnologías que permitan su preservación, pues debido a sus características, son susceptibles a la extinción. Además de tener importancia económica, ornamental, alimenticia, forrajera, entre otras, constituyendo una fuente apreciable de ingresos en las regiones donde existen (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Nevares-Ibarra *et al.* 2000).

Ahora bien, las cactáceas producen flores y frutos, y por consiguiente semillas. La semilla es la unidad de reproducción sexual por excelencia en las plantas superiores, y es la encargada de propagar la especie y dispersarla espacial y temporalmente. De acuerdo con esto, las semillas de las plantas tienen la habilidad de permanecer en estado de actividad mínima durante largos periodos, la germinación desde el punto de vista fisiológico es el proceso que se inicia con el suministro de agua a la semilla y termina cuando el crecimiento de la plántula se inicia, siendo este momento más comúnmente considerado cuando se da la salida de la radícula a través del tegumento (Bewley y Black, 1994).

El desarrollo exitoso de la semilla depende de múltiples influencias en todos y cada uno de los estados de su formación. Además, su estructura está estrictamente unida a la función de la misma. Aunque muchas semillas germinan muy fácilmente, algunas son muy renuentes a germinar. Es necesario establecer la biología de las mismas y algunas condiciones para germinar semillas con éxito. Es por ello que en la actualidad se están tratando de almacenar y mantener el mayor número de semillas de diferentes especies de cactáceas y suculentas en los bancos de semillas o bancos de germoplasma para evitar la extinción de dichas especies. (Lohengrin, 1999). Sin embargo, dentro de los bancos, las semillas van envejeciendo y requieren de una vigilancia periódica de la viabilidad, misma que se lleva a cabo de varias maneras, siendo las dos más utilizadas, las pruebas de sales de cloruro trifeníl de tetrazolio (TTC) (Delouche, 2002), misma que requiere de la disección del germoplasma; o la de germinación; en cuyos casos la semilla se pierde y esto

va mermando el acervo del banco. Es por ello, que este trabajo está enfocado a buscar nuevas alternativas para monitorear la viabilidad y calidad de las semillas, sin que éstas se pierdan.

Las cactáceas

Con unos 200 géneros y 2500 especies, la familia de las cactáceas constituye la más amplia del grupo de plantas suculentas. Los cactus son plantas xerófitas, mostrando tendencia a la reducción de las superficies sometidas a transpiración para disminuir al máximo la pérdida de agua. Estas plantas aparecieron en la tierra hace 600.000 años, por lo que forman un grupo de plantas reciente, en comparación a otras, que surgieron hace 115 millones de años. Los antecesores de los cactus presentaban formas muy semejantes a las de plantas ordinarias. Algunos cactus primitivos tenían tallos y hojas prácticamente normales. Sin embargo, al variar el clima de amplias zonas de la Tierra, los seres vivos tuvieron que evolucionar hacia estructuras y formas que les permitieron sobrevivir en las nuevas condiciones del medio ambiente. El primer representante de esta familia que evolucionó fue *Pereskia*, género primitivo que aún existe, que se adaptó a las nuevas condiciones con cambios moderados. A partir de esta planta, por evolución, surgió el género *Pereskiaopsis*, que además de tallos carnosos, aréolas, espinas y hojas carnosas como su antecesor, presentó gloquidios en las aréolas, y sus hojas eran ya caducas. Los gloquidios se desarrollaron y aumentaron en importancia en las *Opuntia*. El tronco evolutivo llegó a *Quiabentia* y alcanzó un estadio con tallos más gruesos. Luego en *Nopalea*, aparecieron segmentos de forma aplastada. Otro aspecto de la evolución lo constituye la reducción del tamaño foliar, desde *Pereskia*, pasando por las hojas más estrechas de *Pereskiaopsis*, hasta los residuos foliares de *Opuntia*. Además, aunque las hojas de *Pereskia* no son perennes, las de *Pereskiaopsis* se pierden al llegar los fríos, y en *Opuntia* los pequeños residuos foliares atróficos duran sólo mientras el brote es joven. (Bravo-Hollis, 1978; Bravo y Sánchez-Mejorada 1991; Arias, 1997; Hunt, 1999; Dávila, *et al.* 2001; Guzmán *et al.* 2003; Flores, 2004).

Los cactus han desarrollado adaptaciones asombrosas que les permiten enfrentar las adversas condiciones climáticas de las zonas áridas. La mayoría

de sus características morfológicas y fisiológicas están relacionadas con un uso muy eficiente del agua. Al igual que otras plantas como las crasuláceas y los agaves, realizan la fotosíntesis por medio de un mecanismo conocido como metabolismo CAM (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas). Éste les permite realizar la fotosíntesis con un desfase en el tiempo. Durante la noche, cuando la temperatura es menor, los estomas se abren para realizar el intercambio gaseoso, y el bióxido de carbono captado es almacenado en el tejido de la planta en forma de ácido málico. Durante el día cesa la transpiración y, aprovechando la luz solar, la planta realiza la síntesis de carbohidratos utilizando el bióxido de carbono almacenado durante la noche. Al no transpirar durante el día, la planta evita la pérdida excesiva de agua. Este proceso la obliga a producir grandes masas de tejido de almacenamiento, en el que además de acumular el ácido málico, en el cual se fija el bióxido de carbono, se almacena agua. La energía que la planta gasta en producir este tejido, repercute directamente en su crecimiento, ya que la proporción entre el tejido de almacenamiento y el de crecimiento es mayor que en el de la mayoría de las plantas, motivo por el cual las cactáceas tienen un lento crecimiento. La falta de hojas y la presencia de espinas o pelos refrigerantes en algunas especies, ayuda a la planta a disminuir el calor provocado por la incidencia de los rayos solares. Sin embargo, las mismas características que les han permitido ser tan exitosas en medios áridos, representan limitaciones en otros medios. La gran cantidad de agua presente en sus tejidos les impide sobrevivir en lugares donde la temperatura desciende por debajo de cero grados centígrados por periodos prolongados, ya que esto provocaría la muerte de sus tejidos por congelación; por ello, la distribución de las cactáceas se limita casi solamente a las regiones áridas y semiáridas (Hunt, 1999; Arbiza, 2003; Flores, 2004).

Es importante señalar que esta diversidad ha sido alterada por la modificación de sus ecosistemas, poniendo a varias de estas especies en serios problemas de sobrevivencia. Entre los factores que afectan a las poblaciones silvestres se encuentran la ganadería (caprina), agricultura, asentamientos humanos, construcción de vías de comunicación (carreteras, caminos y tendido de líneas eléctricas), extracción de materiales para

construcción, basureros, construcción de presas y la extracción ilegal de plantas para el comercio nacional e internacional (Ybarra, 2003).

Muchos son los esfuerzos que se han hecho por proteger estas codiciadas plantas; dentro de ellos destaca el valioso trabajo realizado por diversos jardines botánicos, así como por varios centros de investigación y asociaciones civiles. Algunos investigadores se han dado a la tarea de estudiar la distribución y biología de las cactáceas, al mismo tiempo que se han creado centros de propagación y distribución de cactus como una medida que ayude a disminuir la presión sobre las poblaciones naturales, al igual que se han ido creando bancos de semillas para su almacenamiento, cuidado y protección del germoplasma de muchas especies (Olfield, 1997; Zimdahl, 2003).

El papel de las cactáceas en México.

Las cactáceas son una familia de plantas que habitan generalmente en ecosistemas desérticos; suelen tener tallos gruesos y carnosos, hojas que la evolución transformó en espinas, flores delicadas, de brillantes colores, vistosas y efímeras, y frutos jugosos. Las cactáceas son, hoy día, de las plantas más codiciadas. La familia Cactaceae es endémica de América; su distribución natural abarca prácticamente todo el continente, con excepción de las regiones por encima de los 5600m de latitud norte. Sin embargo, la mayoría de las especies, alrededor de 70%, se distribuyen en regiones áridas y semiáridas, constituyendo en varias zonas elementos dominantes de la vegetación. En México, una gran variedad de cactáceas ha conquistado los extensos territorios áridos del norte y centro del país, llegando a ser, probablemente, las plantas más características del paisaje mexicano y nuestro país se considera como el de mayor diversidad para la familia (Arias, 1993; Arbiza, 2003; Guzmán *et al.* 2003; Covarrubias, 2005).

México es el país que alberga la mayor riqueza en especies de la familia Cactaceae con alrededor de 850 especies que corresponde a 45% de la totalidad de esta familia nativa del continente americano. También en México se encuentra el mayor número de especies endémicas, es decir cerca del 85 % de las especies mexicanas crecen solamente en este país (Arbiza, 2003).

El uso de las cactáceas en México es muy variado y se remonta a épocas anteriores a la llegada de los españoles. El consumo de los tallos y los frutos como alimento humano es, probablemente, el uso más común que los antiguos pobladores de México dieron a estos vegetales. Sin embargo, muchas especies tenían un uso medicinal o eran fuente de materias primas para la construcción y la elaboración de armas de caza y pesca, así como de diversas herramientas. Algunas de ellas llegaron a tener un significado divino y se utilizaban en ceremonias religiosas. Además de su uso como alimento humano, las distintas especies de cactus se han utilizado para fines muy diversos, como cercos vivos, para retener el suelo, como forraje, como fuentes de mucílagos, gomas y pectinas, como colorantes, etc.. Pero su uso más común, quizá sea como plantas ornamentales. La atracción del hombre por las cactáceas no es reciente. Ya en la época prehispánica eran plantas muy valoradas por su belleza. Los primeros ejemplares que cruzaron el Atlántico, llegaron a España a principios del siglo XVI, y a finales de ese mismo siglo ya se registran en diversos jardines botánicos y colecciones particulares en Italia, Alemania y Holanda. No obstante que el saqueo de plantas ha sido constante desde entonces, es desde el siglo pasado cuando la cactofilia se ha convertido en una seria amenaza para esta familia. El saqueo ha sido brutal, miles de toneladas de plantas han sido arrancadas de su hábitat natural para ir a formar parte de jardines y colecciones privadas en todo el mundo. La demanda internacional se ha abastecido fundamentalmente con la extracción de plantas y semillas de su hábitat natural. La afición de muchos coleccionistas por adquirir plantas exóticas representa una presión para las poblaciones silvestres. Esta situación ha llevado al desarrollo de una compleja red de comercio ilegal que ha afectado de manera determinante las poblaciones naturales y ha colocado a muchas especies en situación de riesgo. La problemática de la protección y conservación de las cactáceas es muy compleja. La mayoría de las especies que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas, de distribución restringida, o son especies recientemente descubiertas, por lo que se conoce muy poco de su biología. A esto se agrega el hecho de que la mayoría presenta un lento crecimiento y tiene ciclos de vida muy largos. Vemos pues que sus características tanto biológicas como ecológicas hacen de las

cactáceas un grupo altamente vulnerable (Gilpin, 1987; Cruz, 1997; Arbiza, 2003; Guzmán *et al.* 2003; Covarrubias, 2005).

Por ello, en la actualidad se procura mantener un stock de semillas de cactáceas y suculentas, almacenados en los bancos de semillas o bancos de germoplasma; los cuales utilizan poco espacio y pueden evitar la pérdida de las especies amenazadas y/o en peligro de extinción. Sin embargo, existen algunas limitantes para su almacenamiento como: el tipo de semilla ortodoxa o recalcitrante, si se encontraba en el banco natural (en la capa superficial del suelo) y por cuánto tiempo, o si es colectada de la planta madre, si el fruto está maduro, si las semillas son viables o vanas, etc. Para ello, es necesario conocer más a fondo la biología de las plantas y principalmente la de las semillas que se pretenden almacenar.

Tipos de semillas

En función de la capacidad de deshidratación de las semillas se clasifican en dos tipos: las recalcitrantes y las ortodoxas. Las recalcitrantes son aquellas que no soportan la deshidratación por debajo de un contenido de agua relativamente alto (40-50%) sin que experimenten pérdida de viabilidad más o menos inmediata y tampoco soportan enfriamiento sin que se altere de manera drástica su capacidad de germinación, muriendo en la mayoría de los casos en un lapso de tiempo breve, además de que se caracterizan por tener tasas de respiración altas en las cuales los radicales libres son generados en los ejes embrionarios después de haber sido deshidratadas (Hendry, 1997). Las semillas ortodoxas las cuales se caracterizan por tener tasas de respiración bajas y la viabilidad puede prolongarse por un largo periodo de tiempo, éstas pueden ser deshidratadas a contenidos de humedad bajos (5% del peso fresco base) sin daño y el papel de los radicales libres en la inducción de la mortalidad no está resuelto en su totalidad (Roberts y Ellis, 1989; Cuevas, 2000).

Estos radicales libres hacen que la semilla vaya envejeciendo, perdiendo así viabilidad y su capacidad de germinación.

El proceso de envejecimiento en semillas

El envejecimiento de las semillas, se manifiesta con una reducción en la capacidad de germinación o con la producción de plántulas débiles (Stewart y Bewley, 1980).

Sin embargo, las semillas, de manera natural, experimentan un proceso de deterioro de sus actividades biológicas y una pérdida funcional conforme transcurre el tiempo, desde su producción por la planta madre, hasta perder su capacidad de germinar, lo que eventualmente la llevará a la muerte (Gómez, 2000; Delouche, 2002). Este proceso se ha ligado a cambios en moléculas biológicamente activas del embrión y las principales modificaciones de esas moléculas pueden ser sólo una variación en sus concentraciones o bien transformaciones químicas. Su capacidad de germinar, es la más obvia de las actividades de una semilla. Pero la germinación puede disminuir, como porcentaje, en una población de semillas con el paso del tiempo, a esto se le llama envejecimiento. El envejecimiento determina el vigor de las mismas, así como su nivel fisiológico de deterioro (Priestley, et al. 1985; Priestley, 1986). Todos los cambios, incluyendo las alteraciones fisiológicas deletéreas que ocurren en las semillas durante el almacenamiento se deben al tiempo, además de otros factores tales como condiciones de maduración, integridad física y otros (Priestley, 1986).

El proceso de envejecimiento se ha referido a la temperatura, el contenido de agua de las semillas y la atmósfera (Roberts y Ellis, 1989), la condición genética y la calidad inicial de las semillas (Powell y Harman, 1985) como los factores que influyen más profundamente en la longevidad, además de cambios que ocurren en las principales biomoléculas del embrión, este fenómeno ha sido asociado a: eventos estresantes, la conformación del ADN, del ARN, la estructura de lípidos y la funcionalidad de las membranas, junto con la capacidad de reparar el ADN alterado o el cambio en los lípidos (Hendry, 1997); sin embargo, los mecanismos que llevan a dicho envejecimiento aún no son bien entendidos, si bien la degeneración a nivel de ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos han sido explicaciones planteadas para las causas y consecuencias de dicho evento. Uno de estos enfoques trata de explicar el

deterioro de las semillas como una consecuencia de la formación de radicales libres en sus células (Hendry, 1993).

Una contribución importante a este debate ha sido ubicar a los radicales libres como los responsables del mecanismo causal de la pérdida de vigor o de viabilidad, las cuales, son las principales características del envejecimiento en semillas (Hendry, 1993).

Un radical libre es una especie química que tiene la característica de poseer electrones desapareados. Esta característica confiere una gran reactividad a las mismas, por lo que pueden reaccionar con un gran número de moléculas, dando comúnmente como resultado la pérdida de la actividad biológica en la célula (Zentella, y Saldaña, 1996).

La formación de radicales libres

Ahora bien, ¿cómo se forman los radicales libres responsables del envejecimiento o el proceso de peroxidación de ácidos grasos insaturados? Sería relativamente fácil relacionar las observaciones de daño en ADN o lípidos con el daño causado por radicales libres si el tejido no fueran semillas. Ya que, la relación que existe entre la degradación de lípidos de productos vegetales y especies de oxígeno activadas ha sido claramente establecido. ¿Pero qué pasa en semillas?

En otros tejidos que no sean semillas, se ha demostrado que existen varias formas de generar especies de oxígeno activas: 1) a través de catálisis enzimática de peroxidasas, oxidasas y oxigenasas; 2) mediante la fuga de electrones en el transcurso de la cadena de transferencia electrónica; 3) por la ausencia o disminución de mecanismos de protección debidos a antioxidantes constitutivos o actividad de enzimas tales como las peroxidasas y, 4) por reacciones de autoxidación donde el oxígeno reacciona con moléculas biológicas y se transforma a especies reducidas más reactivas. Existen evidencias que sugieren que todas estas rutas están activas como fuente de radicales libres en plántulas, en los últimos estadios de la germinación después de la imbibición y en la mayoría de las semillas recalcitrantes. El problema es demostrar si estas rutas están presentes y activas también en las semillas ortodoxas (Hendry, 1997). Además existe un debate sobre si la peroxidación es

una causa principal de pérdida de viabilidad en las semillas o si esta ocurre sólo después de su muerte, como parte de un proceso de deterioro general de las mismas (Priestley, 1986). El esquema de la Figura 1 ha sido planteado para ilustrar mejor este problema (Halliwell y Gutteridge, 1984).

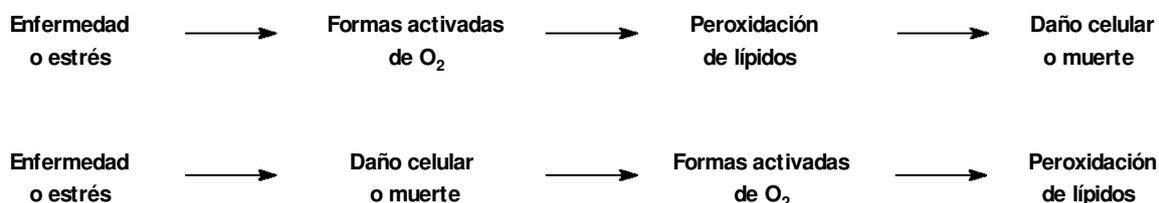


Figura 1. Secuencia de eventos de la pérdida de viabilidad planteado por Halliwell y Gutteridge, 1984.

La principal fuente molecular de radicales libres es el oxígeno, el cual ha sido señalado como causante del envejecimiento (Hendry, 1993). Ya que, en presencia de oxígeno las cadenas alifáticas de los ácidos grasos insaturados se oxidan espontáneamente produciendo radicales libres altamente reactivos llamados hidroperóxidos y una variedad de productos secundarios a partir de la descomposición de este último (Wilson y Mc Donald, 1986), principalmente el radical superóxido (O_2^-) y el anión peróxido (O_2^{2-}), para lo cual se requiere de una fuente de electrones, un oxidante y un metal como el Hierro. Por ejemplo, si el radical superóxido se combina con peróxido de hidrógeno se obtiene el radical hidroxilo ($HO\bullet$) de particular importancia en Biología debido a que reacciona con la mayoría de las moléculas presentes en los seres vivos, tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El radical hidroxilo puede ser obtenido también de manera directa por la reducción de peróxido de hidrógeno por hierro (Hendry, 1993).

Sistemas de modelos membranosos empleando monocapas de ácidos grasos polinsaturados o bicapas fosfolipídicas insaturadas han demostrado que producen epóxidos e hidroepóxidos, más que simples hidroperóxidos como productos principales (Mead, 1980). Más aún, hidroperóxidos y otros ácidos grasos oxigenados son suficientemente estables para ser aislados y han sido detectados en tejidos (Asakawa y Matsushita, 1980) por Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), lo que ha sido esgrimido como un

argumento a favor de la hipótesis de peroxidación lipídica. Las biomembranas representan un sitio clave para el daño directo a partir de peroxidación lipídica, ya que poseen una gran superficie y son usualmente más insaturadas que los lípidos de reserva (Ohlrogge y Kernan, 1982). Esto trae como consecuencia cambios en la permeabilidad de la membrana y, eventualmente, la pérdida de su fluidez e integridad (Dell' Aquilla, 1994). La peroxidación lipídica es por lo tanto potencialmente dañina para las semillas en tres formas: Por la destrucción de los lípidos membranales, por cooxidación de radicales libres y por la formación de aldehídos citotóxicos (los cuales pueden inactivar proteínas) (Wilson y Mc Donald, 1986).

Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados

La susceptibilidad de los ácidos grasos insaturados al ataque por radicales libres sería resultado de su naturaleza química, pues los hidrógenos unidos a los carbonos que forman el doble enlace podrían ser extraídos por un radical libre, generando como producto otro radical libre basado en el ácido graso, al cual se denomina hidroperóxido, según el esquema de la Figura 2.

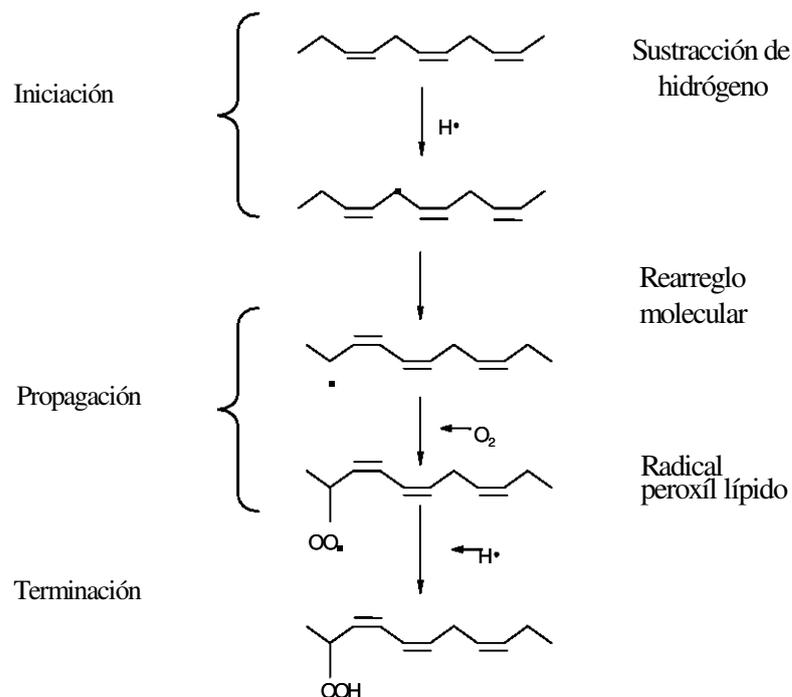


Figura 2. Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Wilson y Mc Donald, 1986).

Es evidente a partir del esquema anterior porqué los ácidos grasos insaturados serían tan susceptibles de peroxidarse, pues podrían estabilizarse tras la substracción de sus hidrógenos mediante la resonancia de sus enlaces dobles.

El radical libre que sustrae al hidrógeno del ácido graso insaturado en la iniciación podría ser de naturaleza variada (el radical superóxido, el ión peróxido, el radical hidroxilo u otros), el radical libre orgánico formado durante la propagación podría formar otro compuesto antes de reaccionar con otra molécula o reaccionar él mismo con esta última y, finalmente en el proceso de terminación la naturaleza del radical libre implicado podría ser diferente, dando como resultado una gran variedad de productos (Wilson y Mc Donald, 1986).

Indices de peroxidación lipídica en semillas

Dado que la peroxidación de los ácidos grasos afecta procesos vitales en las semillas, se han implementado diferentes técnicas para intentar seguir el proceso de dicha peroxidación y correlacionarla en función del tiempo, ya sea con el proceso de envejecimiento natural o con la inducción de envejecimiento acelerado, de acuerdo a los principales enfoques del fenómeno: determinando la concentración de ácidos grasos insaturados y saturados y calcular la relación entre ellos, determinando la presencia y concentración *in situ* de productos secundarios de dicho proceso y detectando la presencia de radicales libres *in situ*, principalmente por:

- 🚩 La detección de ácidos grasos saturados e insaturados durante el envejecimiento utilizando GC-MS, GC- detector de ionización de flama (Harman y Mattic, 1976., Halistones y Smith, 1988., Pucacka, 1991).
- 🚩 Detección de productos secundarios de la peroxidación de ácidos grasos como del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Stewart y Bewley, 1980).
- 🚩 La presencia de radicales libres *in situ* con la prueba de spin por resonancia electrónica paramagnética (EPR). En particular con la prueba no destructiva de spin (Hepburn *et al.* 1986), se han estudiado los cambios de permeabilidad de membranas y en semillas íntegras envejecidas. Así mismo, se ha empleado esta técnica en diferentes

estructuras de la semilla como testa y ejes embrionarios (Khan *et al.* 1996; Golovina *et al.* 1997).

- 🚦 Detección de la permeabilidad de la membrana por el registro de la conductividad eléctrica después de la imbibición de las semillas. Se ha observado que la peroxidación lipídica en la membrana incrementa la filtración de compuestos iónicos de la misma (Halistones y Smith, 1988).
- 🚦 Detección de la actividad enzimática. Este método es específico de enzimas encargadas de detoxificar a las células de especies de oxígeno activadas, como superóxido-dismutasa, lipoxigenasa y peroxidasa (Sacandé *et al.* 2000).

Estas técnicas están en función principalmente de la sensibilidad y costo de la técnica. Cabe destacar el hecho de que sólo las técnicas basadas en procesos espectroscópicos tienen la capacidad de analizar semillas sin dañarlas, pues no requieren la extracción de analitos de las semillas o incluso la germinación de las mismas; éstas técnicas pueden analizar semillas individualmente y tienen límites de detección altos, lo cual resulta muy atractivo desde la perspectiva de la conservación de semillas en condiciones artificiales.

Espectroscopía de Reflectancia en Infrarrojo Cercano (ERIC o NIRS).

La espectroscopía de reflectancia en infrarrojo cercano (ERIC o NIRS por sus siglas en inglés) es una técnica espectroscópica rápida y no destructiva que es usada ampliamente para analizar un número cada vez mayor de características relacionadas con la calidad de las semillas en productos agrícolas y alimentarios (Shenk y Westerhaus, 1993). Existen suficientes referencias que ponen de manifiesto la utilidad del NIRS como un método no destructivo para evaluar la calidad de las semillas, pudiendo determinarse por esta técnica la concentración de compuestos tales como agua (Robertson y Barton, 1984), glucosinolatos (Velasco *et al.* 1998), ésteres del ácido sinápico (Velasco *et al.* 1998; Velasco *et al.* 1999), y la composición de ácidos grasos (Velasco *et al.* 1997; Velasco *et al.* 1998; Velasco *et al.* 1999); con niveles de confiabilidad tan altos como 90% o más.

La espectroscopía de infrarrojo emplea un rango de baja energía del espectro electromagnético. En particular, la región espectral del infrarrojo cercano se extiende desde el extremo superior de longitudes de onda visible, alrededor de 750 nm a 4,000 nm (13 000 a 4 000 cm^{-1}). Las bandas de absorción en esta zona son sobretonos y combinaciones de las bandas vibracionales de tensión fundamentales que se producen en la región de 3 000 a 1 700 cm^{-1} (C-H, N-H, y O-H) (Stuart y Ando, 1997).

Por otro lado, la determinación de los niveles de organización biológicos y químicos mediante la técnica de NIRS, ha sido posible por el uso de programas quimiométricos basados en algoritmos de correlación multivariada de mínimos cuadrados parciales (PLS) generando así una huella digital físicoquímica que permite realizar predicciones (Munck *et al.* 2001).

Los análisis quimiométricos.

Es necesario mencionar las ventajas que ofrecen los quimiométricos mediante la técnica de NIRS las cuales consisten en no requerir procesos elaborados en la extracción de analitos. Se emplean pequeñas cantidades de muestra y sobre todo la baja energía del rango electromagnético que se emplea permite realizar ensayos no destructivos de las semillas. La técnica de NIRS se ha empleado para el análisis no destructivo de los ácidos grasos en semillas provenientes de poblaciones domesticadas (Velasco *et al.* 1998), sin embargo, su aplicación en semillas silvestres asociado a la viabilidad es incipiente.

ANTECEDENTES

La Espectroscopia de Reflectancia en Infrarrojo Cercano (NIRS) se ha utilizado para estimar la composición de ácidos grasos en semillas, basados en la información de diferentes regiones del espectro de infrarrojo (Tabla 1), en estas regiones se absorben los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados (Velasco *et al.* 1997).

Tabla 1. Regiones de absorción del espectro en infrarrojo cercano asociadas a los ácidos grasos. Tomado de Velasco *et al.* 1997

Región del espectro (nm)	Vibración	Estructuras
1650-1800	primer sobretono C-H	CH ₂ ,CH ₃
1880-1920	segundo sobretono C=O	-CO ₂ H
2140-2200	combinaciones =C-H + C=C	CH=CH
2240-2380	combinaciones C-H	CH ₂ ,CH ₃

Los modelos quimiométricos permiten relacionar las intensidades de las regiones del espectro mencionadas, con la concentración de los mismos. Realizando correcciones a los espectros, como normalización de señales y derivadas de curvas. Finalmente, se aplica un análisis de validación-cruzada (Cross-validation statistics) para aumentar el rigor de la predicción de las ecuaciones desarrolladas (Velasco *et al.* 1997; Velasco *et al.* 1998).

Los análisis quimiométricos han sido utilizados en diversos estudios, como el realizado en semillas de *Brassica carinata* Braun, en las que se determinó el contenido de los ácidos: palmítico, esteárico, oleico, linoléico, linolénico, eicosanóico y erúcico con un alto grado de confiabilidad (Velasco *et al.* 1997).

También han sido utilizados en otros tipos de estudios; como método instrumental basado en un modelo quimiométrico de la región del infrarrojo medio para analizar el azúcar total y las proporciones de glucosa, fructosa y sacarosa del néctar floral de *Pachycereus pecten-arboriginum* y *Ceiba*

parviflora. El método muestra la utilidad potencial para la predicción de componentes de azúcar de néctar (Flores *et al.* 2003).

La técnica de NIRS también se ha empleado para cuantificar de forma no destructiva algunos derivados de lípidos, como los ésteres del ácido sinápico en semillas de *Brassica. spp* (Velasco *et al.* 1997; Velasco *et al.* 1998; Velasco *et al.* 1999).

En semillas intactas de *Helianthus annuus* se determinaron los ácidos oleico y linoléico en semillas completas, en la testa y en la harina (Pérez-Vich *et al.* 1998).

En semillas de *Brassica napus* y *Stenocereus stellatus*, se obtiene una correlación significativa en la predicción de la concentración de ácidos grasos, por medio de la técnica de NIRS en el cual los tratamientos de envejecimiento (7% de Humedad Relativa (HR)-25 °C; 58% HR- 25 °C: 7% HR-40 °C y 58% HR-40 °C) generaron una disminución en los ácidos grasos de ambas especies (Vergara 2002).

De igual forma, en semillas de *Beaucarnea gracilis* y *Hechtia podantha*, se utilizó la técnica de NIRS y el programa QUANT Plus para correlacionar los ácidos grasos y la viabilidad de dichas semillas; observándose que los ácidos grasos linoleico y oleico disminuyeron drásticamente, así como la germinación durante el envejecimiento acelerado (Zavaleta, 2003).

Finalmente, en semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis*, la peroxidación de los ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico) estuvo directamente relacionada al envejecimiento de las mismas, ésta fue correlacionada por los mismos métodos analíticos (Lozada, 2005).

Con estos antecedentes se pudo elaborar la siguiente hipótesis.

HIPOTESIS

Si envejecimiento de las semillas se manifiesta por medio de la disminución y/o la pérdida de la viabilidad, debido a una peroxidación en los ácidos grasos; esta peroxidación daría como resultado una disminución en la concentración de ácidos grasos insaturados, por lo tanto, el seguimiento de los cambios de dicha concentración por medio de la técnica de NIRS nos puede ofrecer un índice para correlacionar la peroxidación en las semillas y la capacidad de germinación residual de las mismas, además de ser un método no destructivo de estimación de la viabilidad en una población de semillas.

Para verificar la hipótesis anterior se definieron los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el uso de la técnica de NIRS como una alternativa no destructiva que permita correlacionar la peroxidación de los ácidos grasos insaturados y la viabilidad de las semillas de *Pachycereus hollianus* durante el envejecimiento acelerado.

Objetivos Particulares

- ✚ Establecer las condiciones de germinación para las semillas en estudio.
- ✚ Inducir el envejecimiento acelerado en las semillas bajo diferentes condiciones de humedad relativa y temperatura.
- ✚ Determinar la concentración de ácidos grasos saturados e insaturados por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)
- ✚ Registrar los espectros de infrarrojo, mediante la técnica de NIRS.
- ✚ Correlacionar los espectros de NIRS con los resultados de ácidos grasos para obtener un modelo mediante un programa Quimiométrico, que permita predecir el nivel de los mismos.

- ✚ Correlacionar los espectros de NIRS con los resultados obtenidos de germinación para obtener un modelo mediante un programa Quimiométrico, que permita predecir la germinación o nivel de envejecimiento de las semillas.

DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO

Pachycereus hollianus es una cactácea columnar endémica del Valle de Tehuacán Cuicatlán; ésta es utilizada por los habitantes del lugar como cerca viva para delimitación de sus terrenos; además sus raíces mantienen grandes cantidades de suelo evitando así la erosión eólica; sin embargo, se ha observado en la zona, que casi no existen renuevos por semilla, la mayoría de los individuos que se encuentran son por reproducción vegetativa, esto a la larga produce una pérdida de la variabilidad genética y por consiguiente si llegara a existir alguna enfermedad o plaga que atacara a *P. hollianus* los individuos no tendrían forma de sobrevivir y podría perderse la población; es por ello que se necesita contar con un acervo de semillas para poder repoblar en un momento dado, para ello es necesario contribuir con la fisiología de sus semillas; saber cuánto tiempo se pueden conservar, bajo qué condiciones, cómo se deben escarificar después de un tiempo prolongado y saber qué viabilidad se puede obtener a la larga.



Figura 3. *Pachycereus hollianus* planta adulta.

Características de la especie.

Nombre científico: *Pachycereus hollianus* (F. A. C. Weber) F. Buxb. (Figura 3)

Etimología: En honor al inglés Buchanam H. Holl (1820-1886)

Sinonimia: *Cereus hollianus* Weber

Cereus babosus Weber

Cereus brachiatus

Lemairocereus hollianus (Web.) Britton et Rose

Nombres comunes: En Zapotitlán es conocida como "baboso", "cumpes" o "acumpe", mientras que en otras zonas del Valle de Tehuacán recibe nombres como: "chichi de vieja" o "nopal" en San Rafael Coxcatlán; "cardón" en Ajalpan y "tenchalnochtli" o "tuna espinosa" en Zinacatepec. (Rodríguez, *et al.* 2002).

Son plantas arbustivas o arborescentes de 3-5 m de alto. Los tallos con ramificaciones desde la base. Las ramas de 4-6 cm de ancho, erectas, verde oscuras; tienen de 8-14 costillas de 0.8 a 2.5 cm de altura. Las aréolas son de 0.6-1 cm de largo y de 0.5-1 cm de ancho, oblato circulares, distantes entre sí de 1-3 cm, no confluentes y sin surco longitudinal. Tienen de 12-15 espinas radiales de 0.5-3.5 cm de largo, éstas son tubuladas, adpresas, son grises con ápice negro. Tienen de 3-6 espinas centrales, no confluentes, anuladas, tubuladas, de color gris con ápice negro. Con una espina central superior de 2.5-12 cm de largo y una espina central media de 2.5-8 cm de largo. Dos espinas centrales superiores de 1.5-4 cm de largo y dos espinas centrales inferiores de 1.5-3.5 cm de largo. La zona fértil está indiferenciada de la infértil. Las flores son de color blanco, son nocturnas, de 6-10 cm de largo, tubular-infundibuliformes, dispuestas alrededor del ápice. El pericarpelo es de 2-3 cm de largo y de 1.5-2 cm de ancho, es elíptico. Las bractéolas son de 3-5 mm de largo, son triangulares y carnosas, el ápice es acuminado-aristado, los pelos tienen de 0.5-1.5 mm de largo y son de color pardo-amarillentos. El tubo receptacular es de 2.5-4.5 cm de largo; tiene brácteas de 5-8 cm de largo, son deltoides, carnosas, su ápice es acuminado-aristado, los pelos son de 0.5-1.5

cm de largo, son de color pardo-amarillentos con el margen sinuoso. Los tépalos externos son de 0.7-1 cm de largo y de 0.6-0.8 cm de ancho, de lanceolados a oblanceolados, son de color verde, con ápice oblicuo, mucronato. Los tépalos internos son de 1-2 cm de largo y de 0.8-1 cm de ancho, de linear a lanceolados, de colores blancos a verdes, el ápice es acuminado. Los estambres son de 0.8-1.1 cm de largo, con filamentos blancos. Los frutos son de 5-7 cm de largo y de 3.5-6 cm de ancho, son ovoides, de color rojo-púrpura, semicarnosos y de pulpa dulce, éstos tienen espinas de 1-2 cm de largo, éstas pueden ser rígidas o flexibles, son de color amarillo y tienen cerdas de 0.5-2 cm de largo, de color pardo-amarillentas. Las semillas son de 3-4 mm de largo, oblongas, no ruminadas y la testa tiene paredes celulares rectas (Bravo-Hollis, 1978; Arias, 1997; Rodríguez, *et al.* 2002; Flores, 2004; Reyes, *et al.* 2004).

Distribución: Puebla y Oaxaca. Es una especie endémica del Valle de Tehuacan-Cuicatlán (Arias, 2000).

Fenología: Florece entre los meses de Julio y Agosto.

Usos: En algunos lugares utilizan los tallos en la construcción de cercos vivos para delimitar terrenos particulares y terrenos de cultivo. Además, su madera se emplea como material para la construcción de cercas y techos de viviendas o corrales. Sus frutos son comestibles y se usan para elaborar agua fresca (Rodríguez, *et al.* 2002).

En un estudio realizado por Flores (2004), se demostró que los frutos de *P. hollianus* contienen los alcaloides: 3,4 Dimetoxifenetilamina, Salsolidina y Pellotina; sin embargo, con ellos se elabora agua y se comen como tunas frías.

MATERIAL Y MÉTODOS

Características del sitio de muestreo y muestreos

Según el sistema de Köppen modificado por García (1973), el Valle de Zapotitlán Salinas presenta un clima seco semicálido, con una temperatura media anual entre 17.6 y 23.7°C (López *et al.* 2003); el contenido de humedad en el suelo oscila entre 7.5 y 12% y la humedad relativa ambiental entre el 52 y 73% (UBIPRO, 2001); la temperatura del suelo es en promedio de 38°C y la ambiental de 33°C (UBIPRO, 2004).

Se contó con un muestreo inicial proporcionado por el Banco de Semillas de la UBIPRO, de fecha septiembre 2003.

Además se elaboraron 2 muestreos en el Valle de Zapotitlán Salinas, en marzo y en septiembre de 2004, para coleccionar frutos y poder separar las semillas de los mismos.

Tratamientos pregerminativos.

Para establecer las condiciones de germinación se probaron escarificaciones con ácido sulfúrico, clorhídrico e hipoclorito de sodio, a diferentes concentraciones y tiempos de imbibición (Ver Tabla 2); además de someter a las semillas a tratamientos prolongados de TWEEN al 30% y agua, con y sin aereación continua a diferentes tiempos para lograr romper la latencia o quiescencia que pudiera existir en las mismas (Ver Tabla 2).

De todas estas pruebas se logró obtener la óptima, que fue con la que se trabajó para los experimentos, la cual fue: imbibición de 24 hrs en agua con aereación continua.

Determinación de la viabilidad de semillas, por porcentaje de germinación.

Se tomaron 25 semillas *Pachycereus hollianus*, se colocaron en saquitos de gasa en un recipiente con agua y se les proporcionó aereación continua con un aereador durante 24 hrs. Posteriormente se separaron del saco y se lavaron

con TWEEN al 30% y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (3 seg.), colocándolas en ágar bacteriológico al 1% estéril (esterilizado 15 minutos a 120°C, 15 lb/p²) con las siguientes condiciones de germinación: fotoperiodo 12 H Luz/12 H Obs (radiación 80 μmol/s/m²), con una HR del 70% y una temperatura de 28°C ± 2°C. Se cuantificaron los días que tardaron las semillas en romper la testa y emerger la radícula, para poder cuantificar el porcentaje de germinación por día (Godínez-Álvarez y Valiente-Baunet, 1998; Flores, 2001).

Tratamientos de envejecimiento acelerado

En recipientes de plástico con tapa hermética (de 8.5 X 9 cm y 3.5 cm de profundidad), los cuales contenían en su interior una caja de petri, se depositaron 25 semillas de *Pachycereus hollianus*. Afuera de la caja de petri se depositaron 15 ml de disoluciones saturadas de LiCl para formar tres diferentes ambientes de humedad relativa. Los tratamientos de envejecimiento que se utilizaron fueron bajo las siguientes condiciones: 75% HR - 45°C, 65% HR - 45°C, 55% HR - 45°C, 75% HR - 55°C, 65% HR - 55°C, 55% HR - 55°C. con dos repeticiones cada condición (Walters y Ross, 1993). La duración del tratamiento de envejecimiento fue de 15 días, los recipientes se mantuvieron tapados en estufas a las temperaturas antes mencionadas y en condiciones de oscuridad.

Extracción y transesterificación de ácidos grasos de semillas

Se colocaron 20 mg de semillas de *Pachycereus hollianus*, se pulverizaron con Nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y pistilo, descongelando en atmósfera de Nitrógeno gaseoso, se adicionó 1 ml de CHCl₃:Metanol (2:1) y se maceró durante tres minutos. Transcurrido este tiempo se recuperó la muestra en un tubo eppendorf y se agitó en un vortex durante cinco minutos. Con el propósito de separar las fases y poder recuperar la fracción orgánica del extracto, la muestra se lavó con 0.2 ml de una solución de NaCl al 0.9% y se centrifugó a 14,000 rpm (18,000 X g) por cinco minutos. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad y a 4°C, para evitar la oxidación (Priestly y Leopold, 1979). Para llevar a cabo la

transesterificación de los ácidos grasos de la muestra, de la fase orgánica se tomó una alícuota de 100µl, la cual se evaporó con Nitrógeno, para llevar a cabo la reacción de transesterificación se adicionaron 0.5 ml de BF₃ al 12% en metanol y se colocó a ebullición durante veinte minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se recuperó con 1 ml de hexano, finalmente se adicionaron 0.5 ml de agua destilada para lavar la muestra (Priestly, 1985 modificado de Morrison, 1964).

Para la cuantificación de los ácidos grasos se empleó como patrón interno Ácido Heptadecanoico.

Análisis de ácidos grasos por GC-MS

El análisis de la composición de ácidos grasos, se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas Finnigan MAT GCQ. Las condiciones cromatográficas son las siguientes: inyección del modo splitless, temperatura del inyector de 200°C, se utilizó una rampa de temperatura del horno programada desde 100°C (al inicio tres minutos) hasta 250°C (manteniendo 4 minutos) con un aumento de temperatura de 5°C/minuto. La columna del Cromatógrafo de Gases fue del tipo DB-1 (Dimetilpolisiloxano). Se utilizó Helio como gas acarreador a una velocidad de 35cms⁻¹. Las condiciones del detector de masas fueron: temperatura de la línea de transferencia de 250°C, intervalo de 20 a 400 m/z, polaridad positiva, temperatura de la fuente de iones de 200°C, el tipo de ionización fue de impacto electrónico a 70 electro-Volts (eV). Se inyectó 1 µl de la fase orgánica del extracto derivatizado. La identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares y patrones de fragmentación obtenidos de bibliotecas de referencia NIST (National Institute of Standards and Technology).

Registro del espectro de infrarrojo de semillas mediante NIRS

Se procesaron las semillas en el Infrarrojo Cercano un día después de cada muestreo (para evitar que el espectrómetro leyera la humedad adquirida por las semillas dentro de la cámara), obteniéndose un espectro completo para

cada muestra con un rango desde 7800 cm^{-1} a 600 cm^{-1} . Estas semillas, después de haber sido analizadas en el infrarrojo, fueron las mismas que se colocaron a germinar.

El registro se obtuvo en el Espectrofotómetro de Infrarrojo (Perkin Elmer Spectrum 2000), con el accesorio de reflectancia difusa (Spectra Tech), colocando 250 mg de semillas en el portamuestra. Con un intervalo de lectura de $7,800$ a 600 cm^{-1} , 16 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} . Registrándose el logaritmo del recíproco de la Reflectancia ($\log 1/R$).

Modelo mediante el Quimiométrico (QUANT).

Con todos los espectros obtenidos mediante el análisis de infrarrojo se alimentó el Programa QUANT versión Plus, asignándole los valores de la concentración de ácidos grasos y los de germinación de acuerdo al tratamiento utilizado, empleando algoritmos de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) y previo a la calibración, se realizó la corrección de la línea base por medio de la derivada de segundo orden con una amplitud de 49 puntos.

Análisis estadísticos

Se realizó Análisis de Varianza (ANOVA) simple (Daniel, 2002), las diferencias se corroborarán con la prueba de Tuckey, con una probabilidad de (<0.05).

RESULTADOS

Tratamientos pregerminativos

Para los tratamientos pregerminativos de las semillas, se utilizaron varias sustancias para escarificación como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico e hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y tiempos; además de tratamientos de imbibición en TWEEN y agua, con y sin aereación continua a diferentes tiempos; obteniéndose que, para las semillas de *P. hollianus* cuando presentan quiescencia, el mejor método pregerminativo es el de 24 en agua con aereación continua, en la cual se obtuvo un 100%, como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos pregerminativos en semillas de *P. hollianus*.

Ácido sulfúrico			
	5 minutos		
Concentración	% de Germinación		
9.75%	50%		
29.25%	40%		
48.75%	30%		
97.5%	15%		
Ácido clorhídrico			
	30 segundos	1 minuto	
Concentración	% de Germinación		
3.77%	0%	0%	
11.31%	2%	33%	
18.85%	10%	36%	
37.7%	15%	40%	
Hipoclorito de sodio			
	30 segundos	1 minuto	3 minutos
Concentración	% de Germinación		
3%	68%	48%	36%
4.5%	72%	30%	40%
6%	50%	70%	80%
Semillas en Agua			
	24 horas	48 horas	36 horas
Tratamiento	% de Germinación		
s/aereación	50%	30%	25%
c/aereación	100%	80%	70%

Cabe resaltar que las semillas empleadas para los tratamientos de escarificación fueron de los muestreos de septiembre de 2003 y marzo de 2004, y los lotes empleados para los experimentos fueron de frutos colectados en septiembre de 2004 y de éstos, sólo se utilizaron los que presentaron una germinación del 98 al 100%.

Envejecimiento acelerado

Habiéndose obtenido el 100% de germinación, se recuperó un total de 3,457 semillas y con éstas se procedió a llevar a cabo el envejecimiento acelerado de las mismas, tomando en consideración la humedad relativa y la temperatura a la que se las sometería para generar un gradiente de envejecimiento. Las condiciones escogidas fueron las siguientes: 55%, 65% y 75% de humedad relativa; y 45 y 55 °C para cada una de las humedades, las cuales se obtuvieron con disoluciones de cloruro de litio a diferentes concentraciones, y se germinaron en una cámara con una HR del 70% y una temperatura de 28 °C ± 2 °C.

En lo que respecta a la germinación de las semillas con los tratamientos de envejecimiento acelerado, se muestra claramente el efecto que tuvo el aumento de humedad relativa y el aumento en la temperatura, mismo que, aunque las semillas son de tipo silvestres y de clima desértico, (el cual se distingue por una temperatura elevada y una humedad relativa baja), se pudo lograr un gradiente de envejecimiento.

Empezando con un 100% de germinación para los tratamientos de 45 °C en los cuales se puede observar que existe una disminución paulatina conforme transcurre el tiempo, y con un 83.5% para los tratamientos de 55 °C, en estos últimos (Figura 4), se puede observar que las semillas desde el primer muestreo disminuyen significativamente su viabilidad; a excepción del tratamiento con mayor humedad relativa (75% de RH), en la cual sólo se obtuvo la germinación de una semilla; conforme transcurrió el tiempo la germinación fue disminuyendo hasta terminar en 43% la más baja para 45 °C y 2.5% para las de 55 °C. Sin embargo el tratamiento con las condiciones más drásticas para las semillas de esta especie, fue la combinación de ambas

(temperatura elevada y humedad relativa elevada), este fue el de 75% de RH y 55°C en el que solo germinó una semilla (Figura 4).

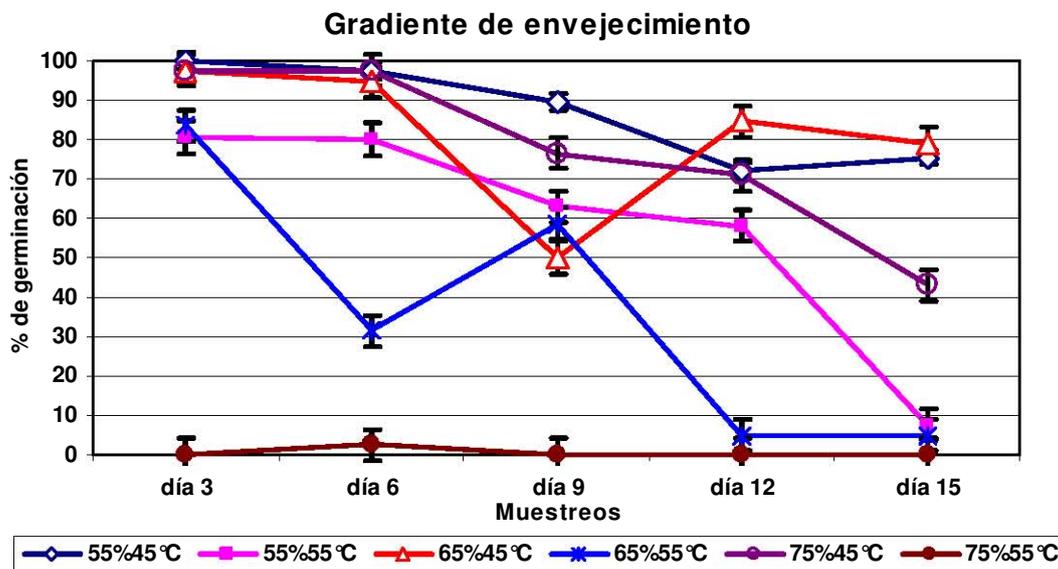


Figura 4. Gradiente de envejecimiento por porcentaje de germinación bajo diferentes condiciones (tratamiento de 15 días).

Transesterificación de los ácidos grasos.

En la transesterificación realizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el método utilizado es específico para ácidos grasos, y permitió definir los siguientes ésteres metílicos de ácidos grasos de las muestras: ácido oleico, ácido linoleico, ácido esteárico, ácido palmítico y el patrón interno: ácido heptadecanoico. Por esta técnica no se detectó la presencia de otros ácidos grasos en las semillas. Además sirvió, para estimar las concentraciones de los mismos, mediante el registro del área bajo la curva, comparándolos con el patrón interno. En la Figura 5, se muestra el espectro de referencia de ácidos grasos para esta especie sin ningún tratamiento. En él, se observan los picos de referencia que corresponden al ácido linoleico con un Tiempo de Retención (RT) de 25.12 min., oleico RT 25.30 min., esteárico RT 25.85 min., palmítico RT 25.39 min. y el patrón interno ácido heptadecanoico con un RT 22.58 min.

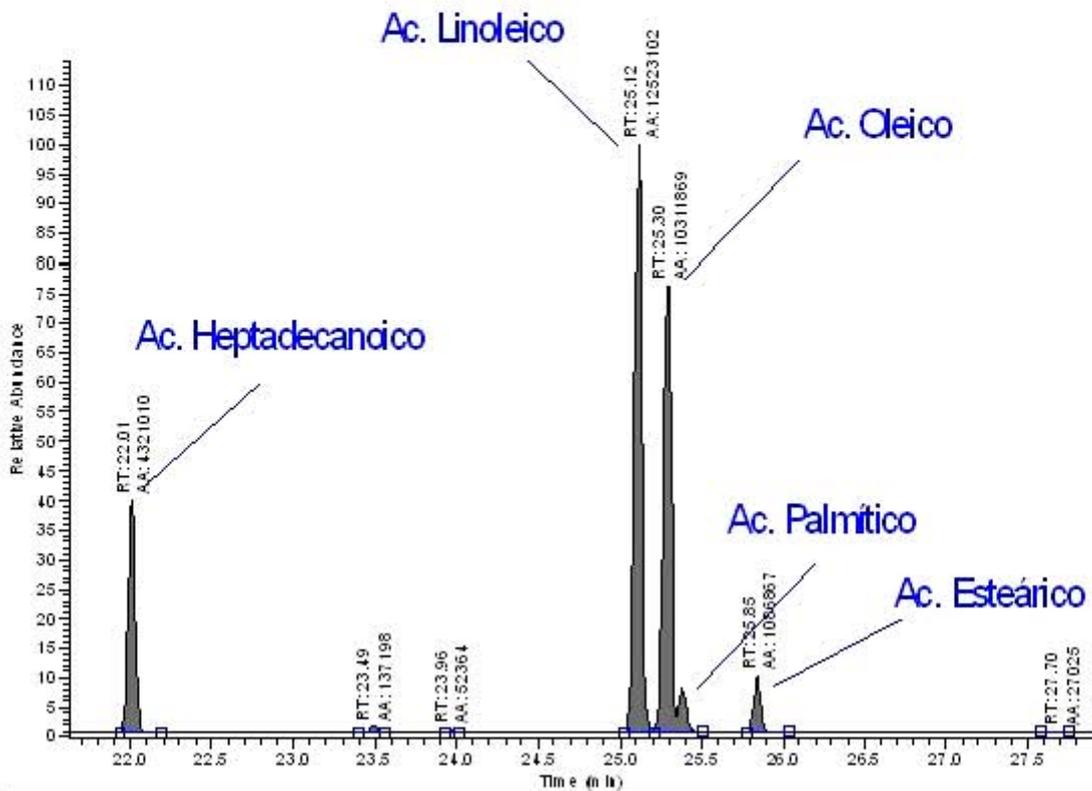


Figura 5. Espectro de ácidos grasos de Pachycereus hollianus

Además de corroborarlos haciendo las fragmentaciones completas de cada uno de los ácidos grasos que se mencionan, tomando como base los pesos moleculares que se obtuvieron de las fragmentaciones que hizo el GC-MS.

Por otro lado, se pudo observar que en todos los ácidos grasos analizados hubo un descenso en los niveles conforme transcurrió el tiempo y las semillas fueron envejeciendo. En la Figura 6, se muestra claramente ésta disminución; la cual para el ácido linoleico empezó con 1.656 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para el control y terminó con 1.181 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (0.475 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menos), el ácido oleico empezó con una concentración de 1.286 $\mu\text{g}/\text{mg}$ hasta 0.890 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (0.396 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menos), para el estearico con 0.214 $\mu\text{g}/\text{mg}$ hasta 0.144 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (0.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menos) y para el palmítico con 0.131 $\mu\text{g}/\text{mg}$ hasta 0.092 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (0.039 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menos); en el Apéndice A se muestran las gráficas de la disminución de todos los ácidos grasos.

Sin embargo, por los resultados obtenidos, podemos observar que los ácidos grasos más afectados, en cuanto a disminución de la concentración fueron los insaturados (ácidos linoleico y oleico).

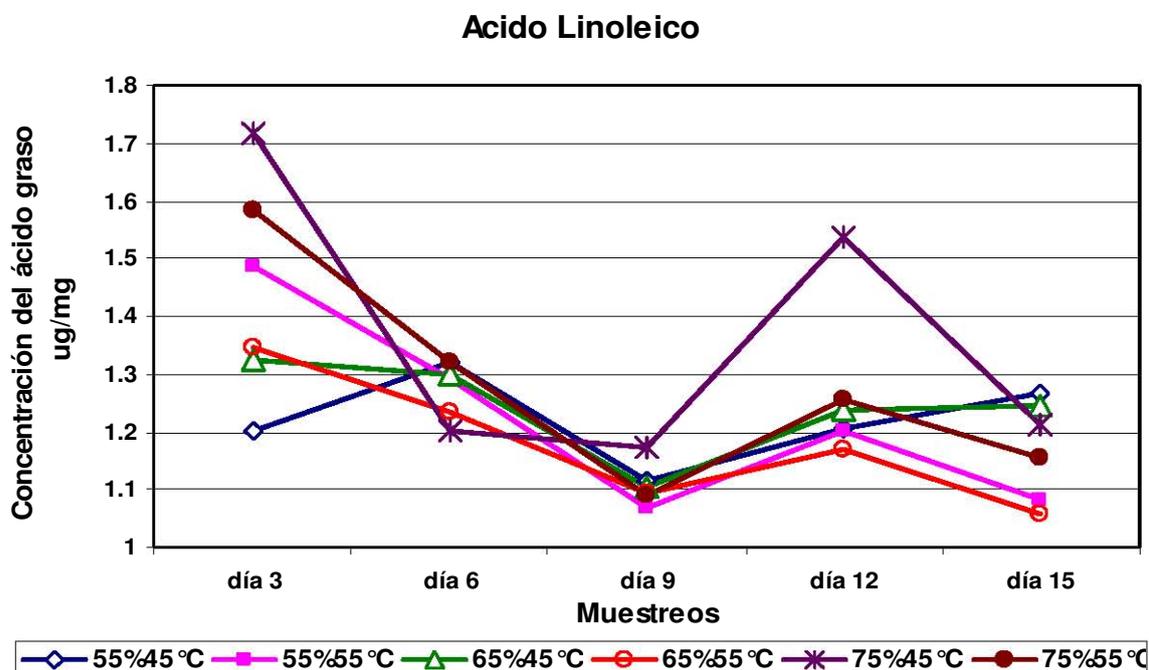


Figura 6. Disminución del ácido graso insaturado Linoleico bajo los diferentes tratamientos de envejecimiento acelerado. Concentraciones de $\mu\text{g}/\text{mg}$ del ácido graso ($n=2$).

NIRS y Quimiométrico

Para el análisis de NIRS se utilizaron las semillas que se encontraban en envejecimiento acelerado, mismas que, después de la lectura en el infrarrojo, se pusieron a germinar, esto permitió comprobar que la técnica de NIRS es una técnica no destructiva.

Con todos los datos obtenidos de germinación, ácidos grasos y espectros de infrarrojo, se procedió a alimentar el programa QUANT Plus (conforme a todas las condiciones de cada tratamiento empleado), para llevar a cabo el análisis quimiométrico, del cual se obtuvo el modelo de predicción para estas semillas, mismos resultados que aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos obtenidos mediante la calibración del quimiométrico.

Factor	% de Varianza	Error estándar estimado	Error estándar de la predicción
Oleico	64.6	0.05712	0.06, 292
Linoleico	96.6	0.03125	0.03987
Esteárico	91.1	0.02490	0.03428
Palmítico	0.98	0.02190	0.02232
Germinación	99.8	0.02803	0.03823

El análisis quimiométrico realizado por el programa QUANT Plus, (con los espectros de infrarrojo y los datos de germinación), generó valores de calibración superiores al 91% de Varianza para el ácido linoleico, esteárico y la germinación y un 64% para el ácido oleico, sin embargo, para el ácido palmítico sólo se logra un 0.98% (éstos porcentajes de varianza son equivalentes al coeficiente de correlación).

En el análisis quimiométrico podemos observar que los ácidos grasos insaturados e incluso el ácido esteárico, el cual es un saturado, nos dan un buen acercamiento de la capacidad germinativa y las condiciones en las que se encuentran las semillas, no así el ácido palmítico.

Estos resultados fueron obtenidos mediante la calibración del análisis quimiométrico y podemos decir que para la predicción de la germinación de las semillas, analizando los ácidos grasos son satisfactorios, ya que para ésta se obtiene un coeficiente de correlación del 99.8%.

Germinación real contra la estimada mediante NIRS

La estimación de la germinación generada por el análisis quimiométrico resultó muy satisfactoria de acuerdo con los datos experimentales obtenidos (Figura 7), con un valor de $R^2 = 0.99$, durante todo el tratamiento de envejecimiento acelerado.

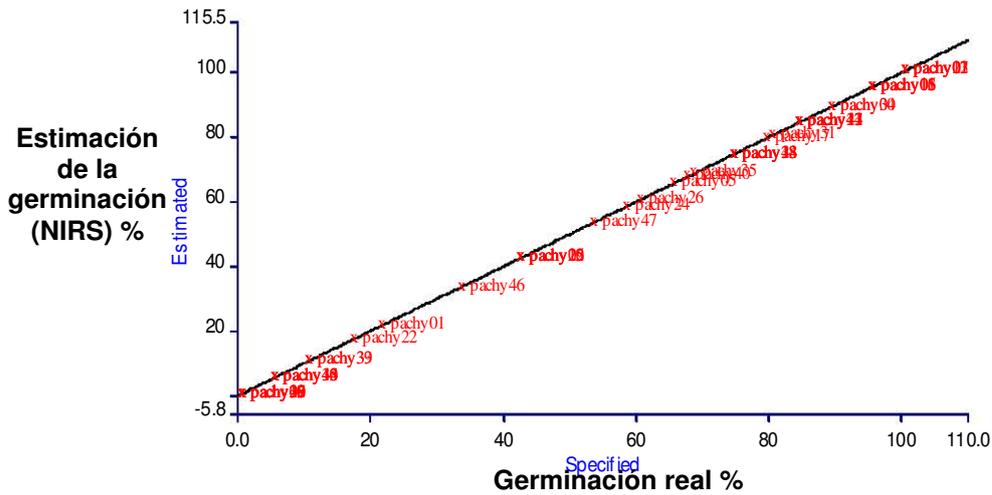


Figura 7. Porcentaje de germinación real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado con registro cada 3 días, n=2).

Contenido de ácidos grasos contra el estimado por NIRS

La estimación del contenido del ácido linoléico generada mediante el modelo quimiométrico (Figura 8), muestra una linealización de los datos muy aceptable, con un valor de $R^2 = 0.98$, durante el envejecimiento acelerado.

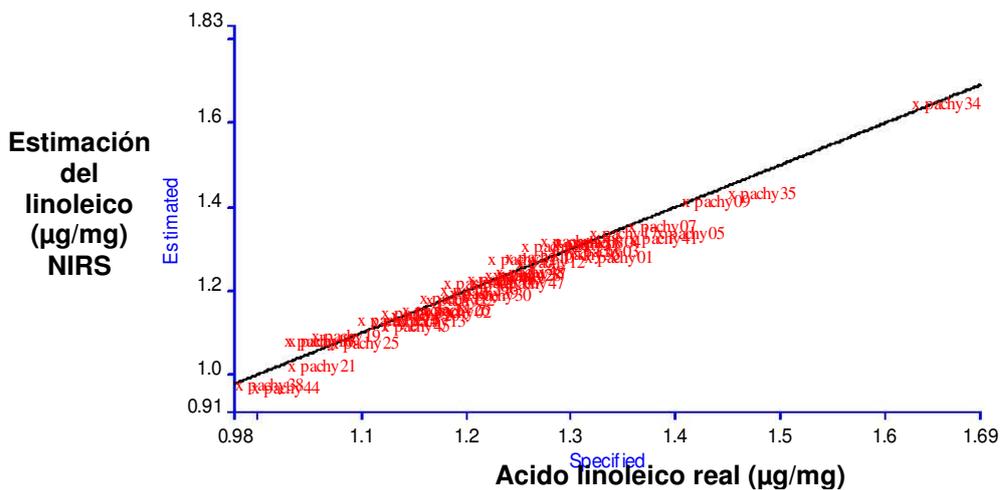


Figura 8. Contenido de ácido linoleico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado con registro cada 3 días, n=2).

Para la estimación del contenido del ácido oleico generada mediante el modelo quimiométrico (Figura 9), muestra una tendencia a linealizar los datos, sin embargo, es aceptable para el modelo ya que cuenta con un valor de $R^2=0.80$ durante el envejecimiento acelerado.

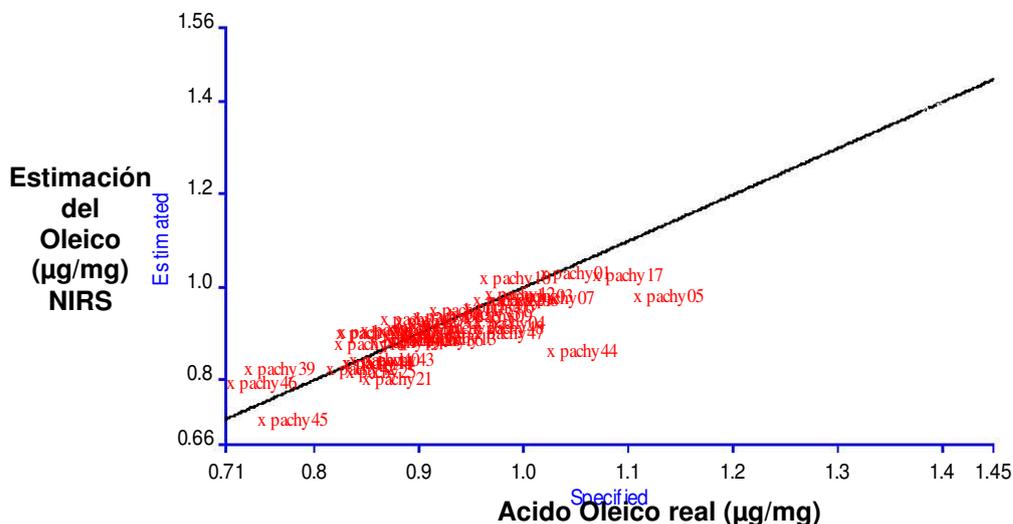


Figura 9. Contenido de ácido oleico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado con registro cada 3 días, n=2).

La estimación del contenido del ácido esteárico generada mediante el modelo quimiométrico (Figura 10), también muestra una tendencia a linealizar los datos, sin embargo, es muy aceptable para el modelo ya que cuenta con un valor de $R^2 = 0.95$ durante el envejecimiento acelerado.

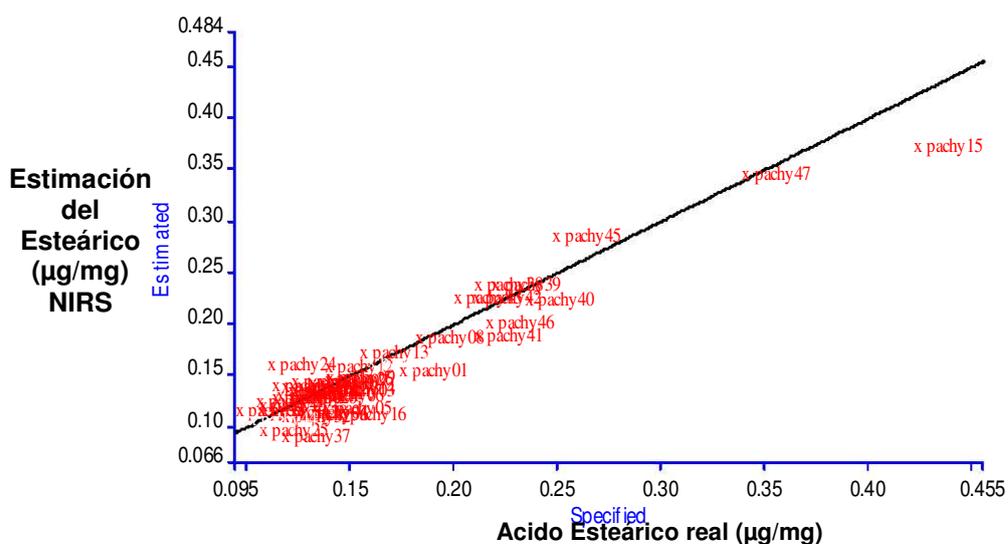


Figura 10. Contenido de ácido esteárico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado con registro cada 3 días, n=2).

En la estimación del contenido del ácido palmítico generada mediante el modelo quimiométrico (Figura 11), se encontró una aglomeración de los datos, esto nos indica que éste ácido graso se mantiene a niveles constantes, ésta es poco aceptable para el modelo ya que sólo mostró un valor de $R^2 = 0.09$ durante el envejecimiento acelerado, este ácido graso, se puede decir que no se ve afectado por el tratamiento o que sus niveles son tan bajos que ésta técnica no es capaz de detectar gran variación en los mismos.

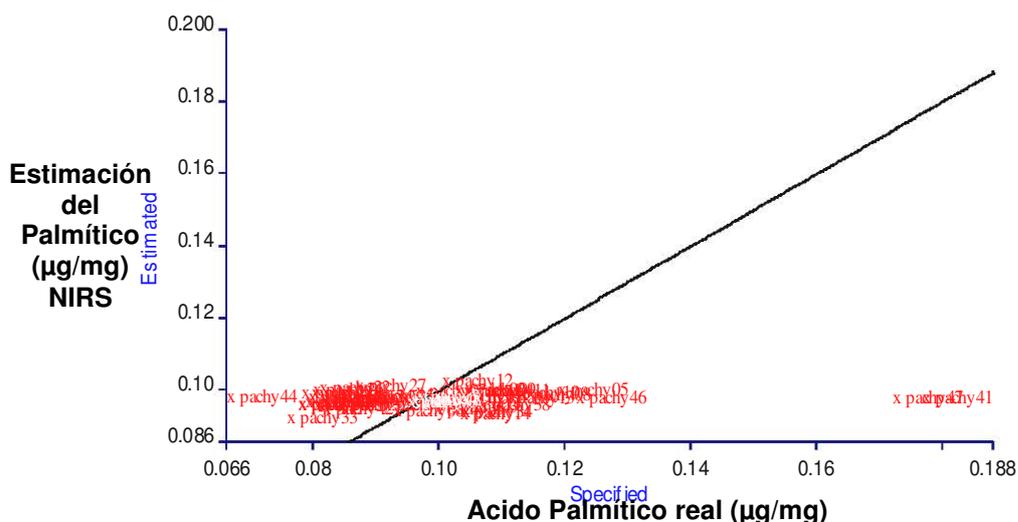


Figura 11. Contenido de ácido palmítico real contra el estimado mediante el modelo quimiométrico en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado con registro cada 3 días, n=2).

Germinación vs ácidos grasos de semillas

Cuando se correlacionaron los datos obtenidos de la germinación y los datos de los niveles de ácidos grasos (Figura 12), se observó que existe una gran correlación entre el descenso de los niveles de ácidos grasos, principalmente los de tipo insaturado (oleico y linoleico) y la disminución de la germinación; lo cual permite decir que, al registrarse niveles bajos de ácidos grasos insaturados, se obtendrá baja germinación en la semillas, por lo menos para esta especie.

En el Apéndice B, se puede observar, que en todos los tratamientos de envejecimiento acelerado, el patrón de descenso de ácidos grasos y germinación correlacionándolos, es el mismo, los ácidos grasos disminuyen al mismo tiempo que la germinación de las semillas.

Se puede observar también que para los ácidos grasos saturados el único que podría aportar datos favorables para una correlación es el ácido esteárico, ya que el ácido palmítico muestra un patrón constante durante todo el tratamiento de envejecimiento acelerado, sin embargo, ya que los niveles de ácidos grasos saturados que se presentan son tan bajos (al rededor de 0.0120 $\mu\text{g}/\text{mg}$), podría ser que éste método no sea lo suficientemente sensible para poder tomarlos como parámetros de envejecimiento en semillas.

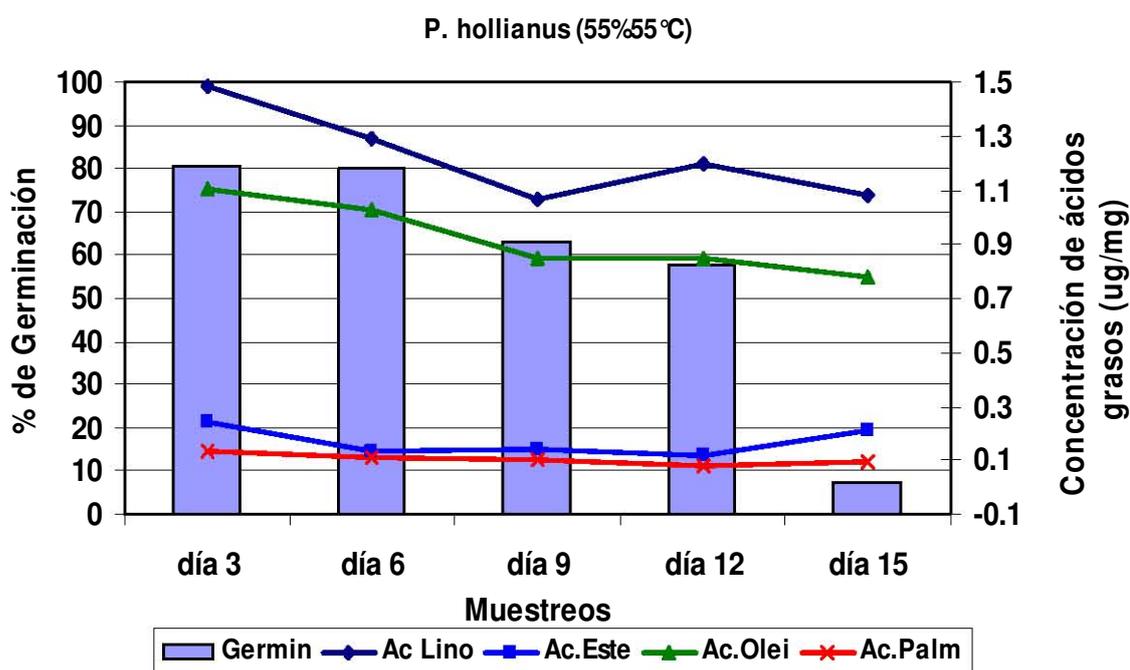


Figura 12. Germinación vs ácidos grasos en semillas de *P. hollianus* después de 15 días de envejecimiento acelerado (tratamiento 55%HR 55 °C).

También podemos observar en la Figura 13, que mientras más elevada se encuentra la humedad relativa en el ambiente, la germinación se verá más afectada. Cabe señalar que el ambiente del cual provienen las semillas tiene una humedad relativa del 7.5% en el suelo y temperaturas superiores a los 30°C, sin embargo, pocas veces se presentan humedades y temperaturas elevadas al mismo tiempo, misma combinación que, como se observó, es letal para las semillas de *P. hollianus*.

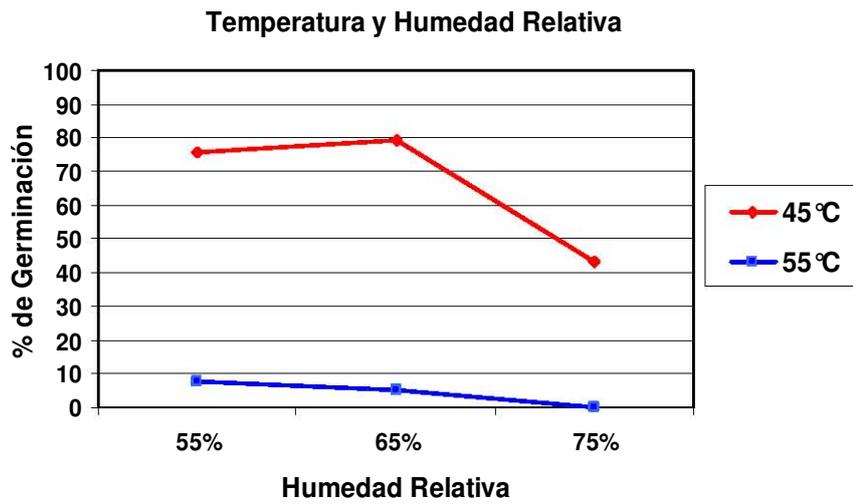


Figura 13. Efecto de la humedad relativa y la temperatura sobre el la germinación.

Los análisis realizados y los resultados obtenidos se trataron de explicar bajo la siguiente discusión.

DISCUSIÓN

Aún cuando las condiciones ambientales sean adecuadas para la germinación de semillas, muchas de ellas no lo hacen, aunque permanezcan viables. La no germinación de las semillas, también se conoce como latencia o letargo (Donald y Zimdahl, 1987), y está ligada a causas intrínsecas de las semillas o frutos, pero también a efectos ambientales.

Aunque muchas semillas germinan luego de la aplicación de humedad y temperatura adecuadas, hay un número considerable que requiere de un tratamiento especial para romper el estado de latencia. La latencia es una condición natural que permite al embrión persistir largos períodos de tiempo. En la naturaleza, esto facilita la sobrevivencia de la especie frente a condiciones ambientales desfavorables. A menudo, los procesos a que es sometida una semilla para su conservación acentúan su latencia (Olfield, 1997).

En este trabajo las semillas utilizadas para los primeros ensayos pregerminativos fueron de muestreos de fechas anteriores a las utilizadas para los experimentos, incluso uno de los muestreos tenía ya un año de almacenamiento, mismas que pudieran haber experimentado algún grado de envejecimiento; además, se puede decir que existen variaciones de germinación dentro de la misma zona, variaciones de tiempo en que fueron colectadas y extraídas las semillas, el tipo de colecta, el grado de madurez de los frutos y por consiguiente de las semillas, así como su manejo y condiciones de almacenamiento (Priestley, 1986), estos factores o alguno de ellos pudieron haber influido en las diferencias obtenidas para su óptima germinación.

Por otro lado, el hecho de que las semillas son de tipo silvestre, implica que la variabilidad genética puede ser mayor, comparándolas con especies que ya han sido estudiadas como cacahuete, frijol de soya y girasol (Gidrol *et al.* 1989; Jeng y Sung, 1994; Khan *et al.* 1996). Además de las condiciones de su hábitat, las cuales, le confieren a las semillas características específicas, como una tolerancia a temperaturas altas (45 °C) y humedades bajas (8% HR) datos de mayo (UBIPRO, 2004); sin embargo, para este trabajo se las hizo germinar a temperaturas de 28 ± 2 °C y una HR ambiental del 70%, condiciones mantenidas en la cámara de germinación durante los 15 días del experimento,

estas condiciones no son siquiera parecidas a su ambiente natural, obteniendo así, germinaciones del 100% inicial.

Con estos antecedentes, para los tratamientos de envejecimiento acelerado se decidió tomar sólo dos temperaturas, ya que, en un trabajo previo se observó que a temperaturas de 60°C la germinación se pierde totalmente (Zavaleta, 2003), por lo que se tomaron sólo temperaturas de 45 y 55°C.

En lo que respecta a los tratamientos de envejecimiento, la germinación de las semillas se puede observar un patrón similar al de los ácidos grasos, esto es, una disminución en los primeros muestreos (días 3, 6 y 9), y una recuperación para el día 12, para luego volver a tener un descenso en el día 15.

En las gráficas de germinación vs ácidos grasos se puede observar mucho mejor esta tendencia a disminuir entre el día 3 y el 9, y para el día 12 existe una recuperación, como ya se mencionó, tanto de la germinación como de algunos de los ácidos grasos, principalmente del linoleico, oleico y esteárico, y para el día 15 vuelve a disminuir. Una explicación alternativa para estos casos, podría ser, que el metabolismo de desintoxicación de las semillas bajo envejecimiento acelerado hubiera sido lo suficientemente capaz de eliminar los radicales libres que se hubieran podido producir durante el periodo de envejecimiento de los tres primeros muestreos, ya sea, por acción enzimática o por la acción de sustancias antioxidantes. En ciertos casos se ha demostrado que la concentración de antioxidantes disminuye en función del tiempo en semillas bajo envejecimiento acelerado de *Acer platinoides* (10% CA a -3°C en 7 años) (Pukacka, 1991) y en cacahuete (79% HR a 45°C en 9 días) (Jeng y Sung, 1994), al igual que presentan una disminución en la actividad de la peroxidasa y la superóxido dismutasa (100% HR a 45°C en 5 días y 79% HR a 45°C en 9 días, respectivamente) (Asakawa y Matsushita, 1980; Velasco *et al.* 1999). Sin embargo, en este trabajo no se cuantificaron ni enzimas ni antioxidantes, por lo cual, no hay forma de corroborar los datos registrados.

Ya sea que los radicales libres se hubieran formado en concentraciones naturales o que hubieran sido desactivados, como se plantea en el proceso de propagación del modelo de peroxidación (Wilson y Mc Donald, 1986).

Otra explicación, podría ser la que se ha denominado reparación metabólica. Esta hipótesis establece que pueden existir ciertas condiciones en

las cuales se observarían efectos que contrarrestaran estos factores nocivos (Wilson y Mc Donald, 1986). La hidratación previa o posterior puede prevenir o reparar los daños causados por radicales libres, como consecuencia de la capacidad del agua de desactivar dichas sustancias. Experimentalmente, la tasa de germinación en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) sometidas a un choque térmico (10°C) previo a sembrarse es mayor que en semillas envejecidas, después de una imbibición por 2 hrs a 20°C y deshidratadas a 45°C por una semana. En éste, el análisis de los ácidos grasos por CG-EM con BF₃ muestra un aumento a los 24 días (para linoleico, oleico y palmítico) y hasta los 72 días de envejecimiento disminuye (Francis y Coolbear, 1988). Tal vez en este trabajo, las condiciones de envejecimiento en realidad estaban proporcionando un ambiente favorable para los eventos de reparación, contrarrestando los efectos nocivos sobre estas semillas.

Cabe mencionar que la peroxidación lipídica asociada al envejecimiento, ha sido estudiada en diversas especies como frijol de soya, tomate, cacahuete, girasol, etc. (Buchvarov y Gantcheff, 1984; Wilson y Mc Donald, 1986; Gidrol *et al.* 1989), en las cuales se observa desde el aumento de malondialdeído (MDA) en diversas estructuras de las semillas, disminución de ácidos grasos insaturados vinculados con una reducción en la germinación.

Como ya se mencionó, la especie está adaptada a un clima extremo (temperatura alta y humedad relativa baja), sin embargo, se pudo observar, que al parecer, la temperatura es un factor determinante para las semillas de *P. hollianus*, ya que, al someterlas a temperaturas de 45°C también se ve afectada la germinación, sin embargo, para la temperatura de 55°C se ve reducida drásticamente.

También se pudo observar, que existe un efecto sinérgico nocivo, entre la HR y la temperatura, así, al someter las semillas a temperaturas de 55°C y HR de 75%, la germinación se pierde en su totalidad.

En lo que respecta a las concentraciones de ácidos grasos, en este trabajo se puede suponer que sí hubo formación de radicales libres ya que los que se vieron más afectados fueron los de tipo insaturado, mismos que son más susceptibles al ataque de radicales libres por las instauraciones que presentan, las cuales, pueden ser cambiadas por algún otro radical, para el caso del ácido linoleico éste posee dos instauraciones, es más ligero, por las

insaturaciones es más polar y por consiguiente es más susceptible al ataque de los radicales libres; en el caso del ácido oleico, éste posee una sola insaturación, para estos dos ácidos grasos la forma de ataque es del tipo HO• (hidroxilo) que como se mencionó, este radical puede reaccionar con la mayoría de las moléculas de los seres vivos (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos).

En lo que respecta al ácido esteárico, este es saturado, así que, su disminución se puede deber a una actividad de forma enzimática de tipo desaturasa (Sacandé *et al.* 2000).

Para el caso del ácido palmítico, que es otro saturado, se mantiene en forma constante, para este caso se tienen varias posibilidades; 1) las concentraciones en las que se presentan son tan pequeñas (0.08 µg/mg), que puede ser que este método no sea lo suficientemente sensible para detectar esas diferencias de concentración, 2) que el tiempo o las condiciones de envejecimiento acelerado no hubieran sido suficientemente drásticas para que el ácido palmítico fuera afectado o 3) que el palmítico pertenezca a los ácidos grasos de reserva dentro de los cotiledones, en cuyo caso, la peroxidación o la acción enzimática, no fue lo suficientemente fuerte para llegar a ellos, ya que en trabajos previos (Vegara, 2002), se ha demostrado que existen ácidos grasos en la testa, en los cotiledones y en el embrión, los cuales tienen diferentes grados de afectación por radicales libres por encontrarse en distintos estratos de la semilla.

A pesar de que no se puede confirmar la formación de radicales libres en las semillas durante los tratamientos de envejecimiento acelerado, por no tener evidencias directas de Resonancia de Spin Electrónico (Hepburn *et al.* 1986) o alguno de los productos secundarios, como las concentraciones de malodialdeído (Wilson y Mc Donald, 1986, Vergara, 2002); con los resultados obtenidos, en particular con la reducción de los insaturados, se puede suponer la participación de los radicales libres como el factor primario del envejecimiento celular.

Alternativamente, existe una posibilidad para reforzar lo expuesto aquí, y para explicar la disminución en la concentración de los ácidos grasos, como la actividad de enzimas de tipo desaturasa, las cuales se activan a niveles bajos de humedad y provocan una disminución en la concentración de los

insaturados (Shanklin y Edgar, 1998), podrían ser incluso en los de tipo saturados, como es el caso del esteárico; en respuesta y como mecanismo de defensa, las semillas entrarán en un estado de dormancia, mediante la cual, la germinación de las semillas se verían reducida, y esto podría explicar la disminución tan drástica de la germinabilidad. Por otro lado, también las condiciones de temperatura elevada podrían desencadenar la dormancia, no obstante que esas condiciones generalmente se presentan en semillas más sensibles como las recalcitrantes, mismas que no toleran la desecación.

También es probable que haya ocurrido un daño a nivel metabólico que desencadenara con mayor rapidez la pérdida de viabilidad y esto se ve reflejado en la disminución tanto de ácidos grasos insaturados como en uno de los saturados.

Este comportamiento es similar al observado en semillas *Beaucarnea gracilis* y *Hechita podantha*, donde los ácidos grasos linoleico y oleico disminuyeron drásticamente, así como la germinación (Zavaleta, 2003).

De igual forma, para *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis*, la peroxidación de los ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico) estuvo directamente relacionada al envejecimiento (Lozada, 2005).

Lo mismo ocurrió en el trabajo realizado por Vergara (2002), quien obtuvo una correlación significativa en la predicción de la concentración de ácidos grasos, por medio de la técnica de NIRS en semillas de *Brassica napus* y *Stenocereus stellatus*, en el cual se observa una disminución en los ácidos grasos insaturados en ambas especies.

Por otro lado, para poder confirmar completamente lo antes dicho, sería necesario realizar este tipo de protocolo al revés, esto es, a semillas sin envejecer producirles una peroxidación directa y medible, para poder traspolar los resultados a la base de datos que se creó de este proyecto y así poder corroborarlo.

Por último y tomando en cuenta los coeficientes de correlación obtenidos en este trabajo podemos asegurar que nuestro método es confiable para hacer predicciones a futuro en semillas de *Pachycereus hollianus* sin tener que destruir las semillas, manteniendo así, los acervos de semillas intactos.

Así, se confirma que la técnica de ERIC o NIRS es confiable para hacer predicciones para *P. hollianus* y otras semillas, además de ser una técnica no

destruictiva, no necesita gran cantidad de muestra, es rápida y económica; por lo que podría ser un método primario en todos los bancos de semillas.

CONCLUSIONES

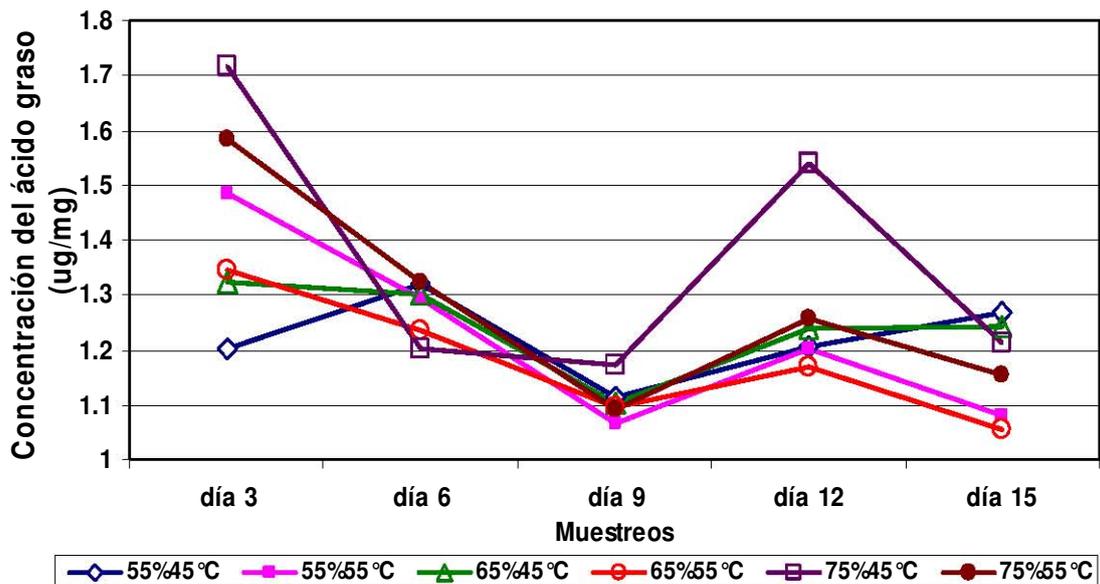
- Las condiciones de germinación para las semillas de *Pachycereus hollianus* son de 24 hrs de hidratación con aireación continua.
- Los tratamientos de envejecimiento acelerado empleados produjeron un gradiente de viabilidad en las semillas de *P. hollianus*.
- La humedad relativa es un factor determinante en la inducción del envejecimiento acelerado en las semillas.
- La sinergia entre temperatura y humedad relativa elevadas inducen un envejecimiento muy acelerado en las semillas, incluso letal.
- La técnica de NIRS y su correlación en el programa QUANT Plus, descrito en este estudio es confiable para predicciones a futuro en semillas de *Pachycereus hollianus*.
- La técnica de NIRS brinda una correlación altamente significativa de las condiciones en las que se encuentran las semillas y para hacer predicciones a futuro de su germinación en *P. hollianus* y otras semillas, sin que sean destruidas o se les cause algún daño; garantizando así, su almacenamiento prolongado en los bancos de germoplasma.

APENDICE "A"

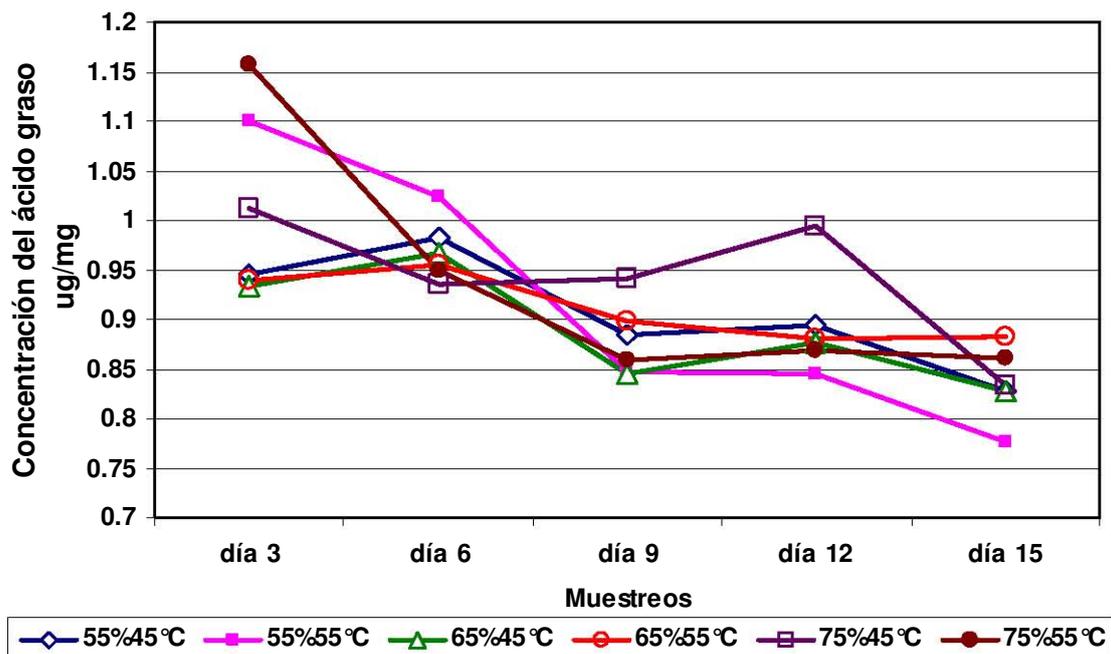
En estas gráficas se muestra la disminución de los diferentes ácidos grasos insaturados y saturados. Los datos presentados están calculados en concentraciones de $\mu\text{g}/\text{mg}$ del ácido graso.

En la última gráfica se puede observar el efecto del envejecimiento acelerado sobre los cuatro ácidos grasos con relación al tiempo.

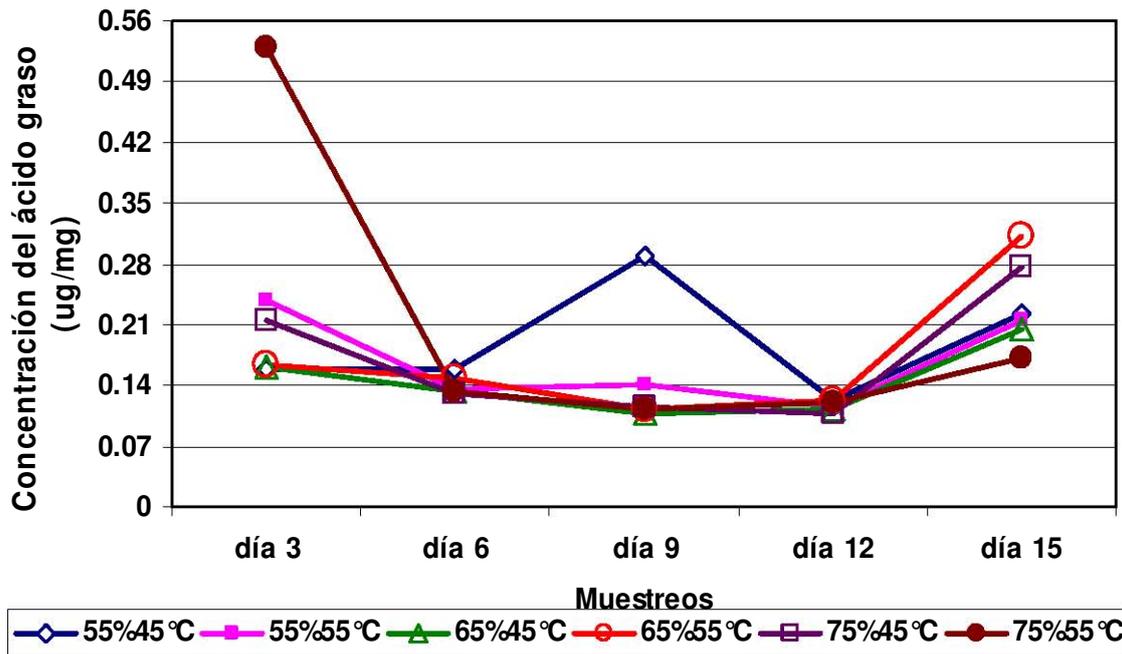
Acido Linoleico



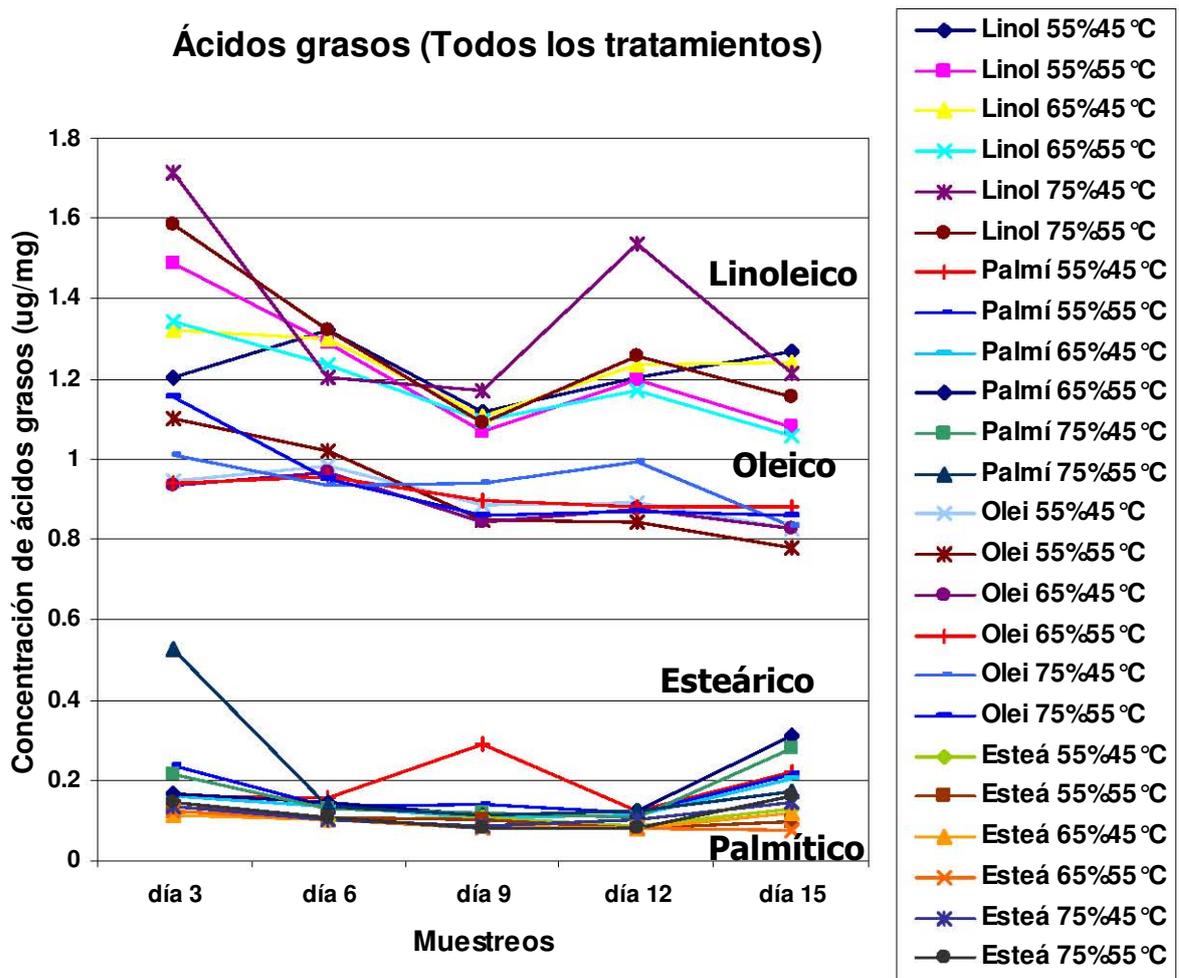
Acido Oleico



Acido Palmítico

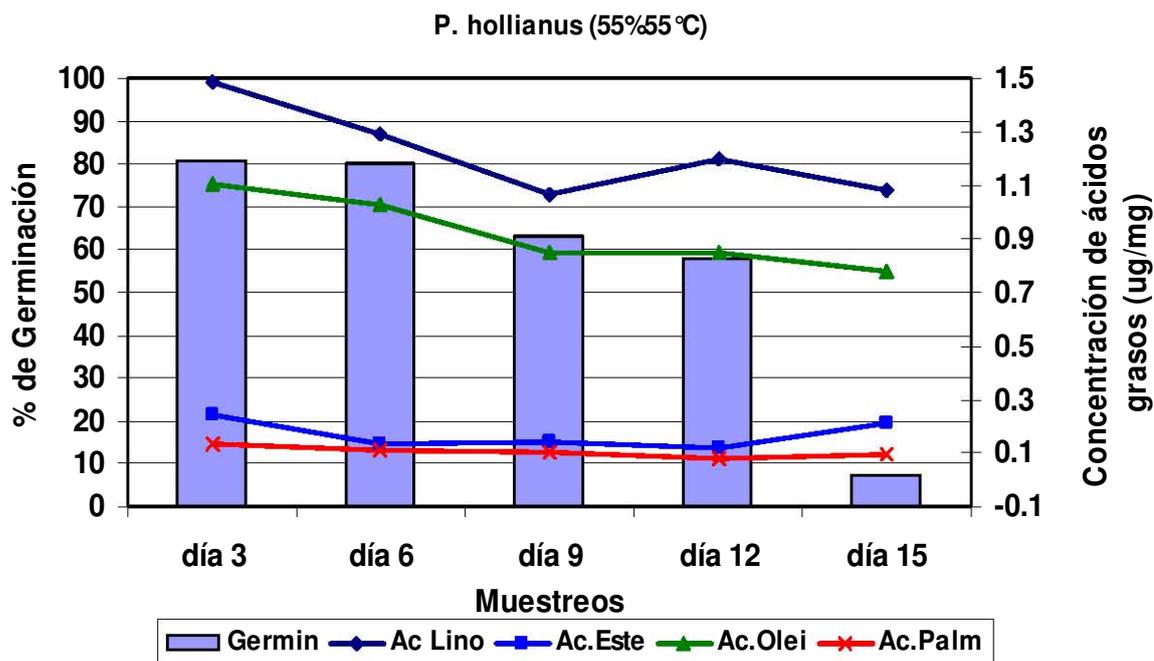
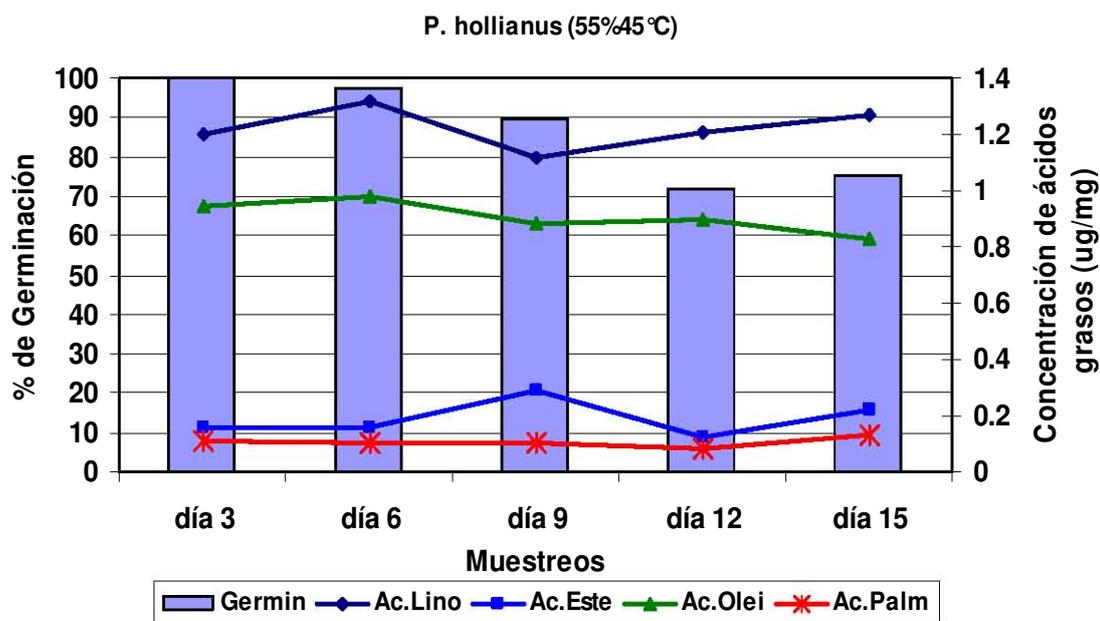


Ácidos grasos (Todos los tratamientos)

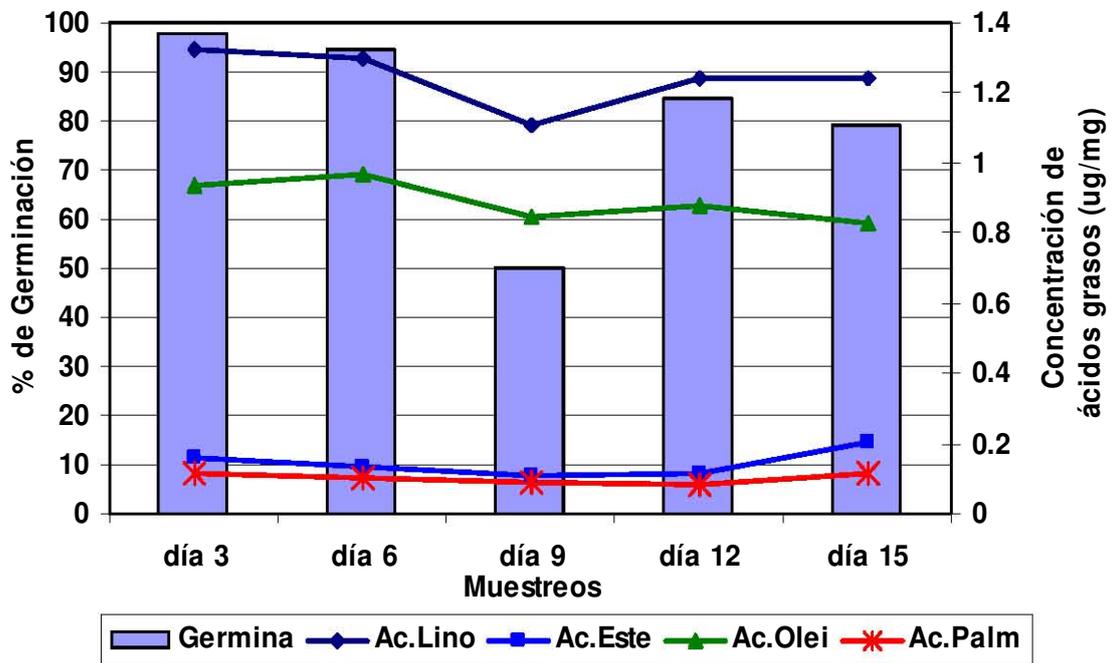


APÉNDICE “B”

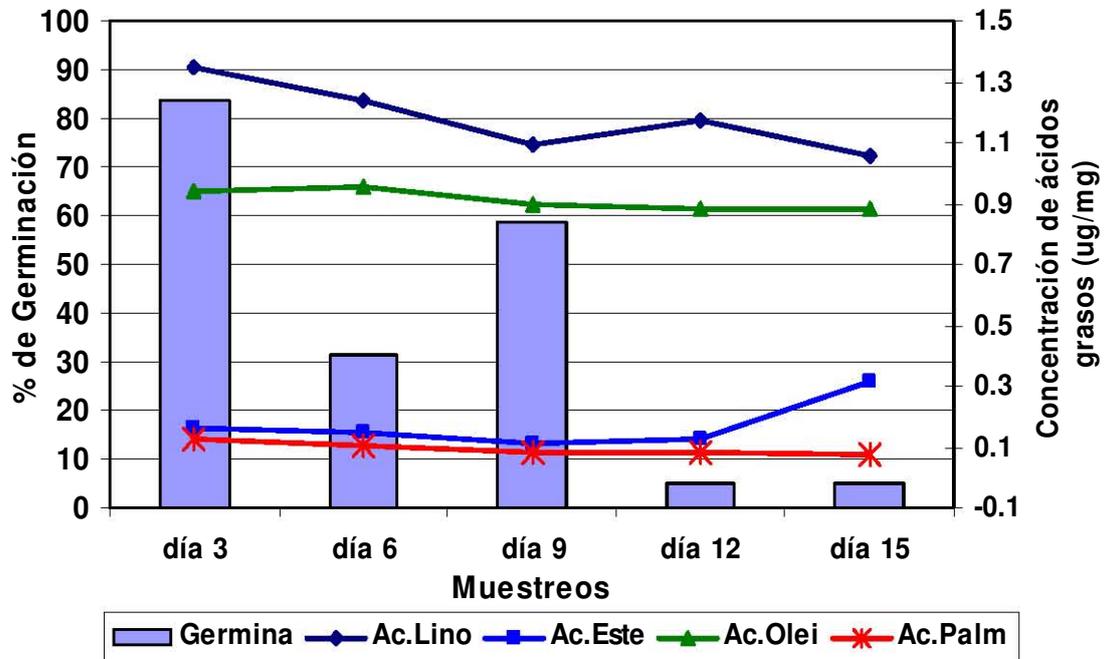
En estas gráficas se muestra claramente la correlación que existe entre las concentraciones de los diferentes ácidos grasos y la respuesta de las semillas en la germinación, bajo los diferentes tratamientos de envejecimiento acelerado.



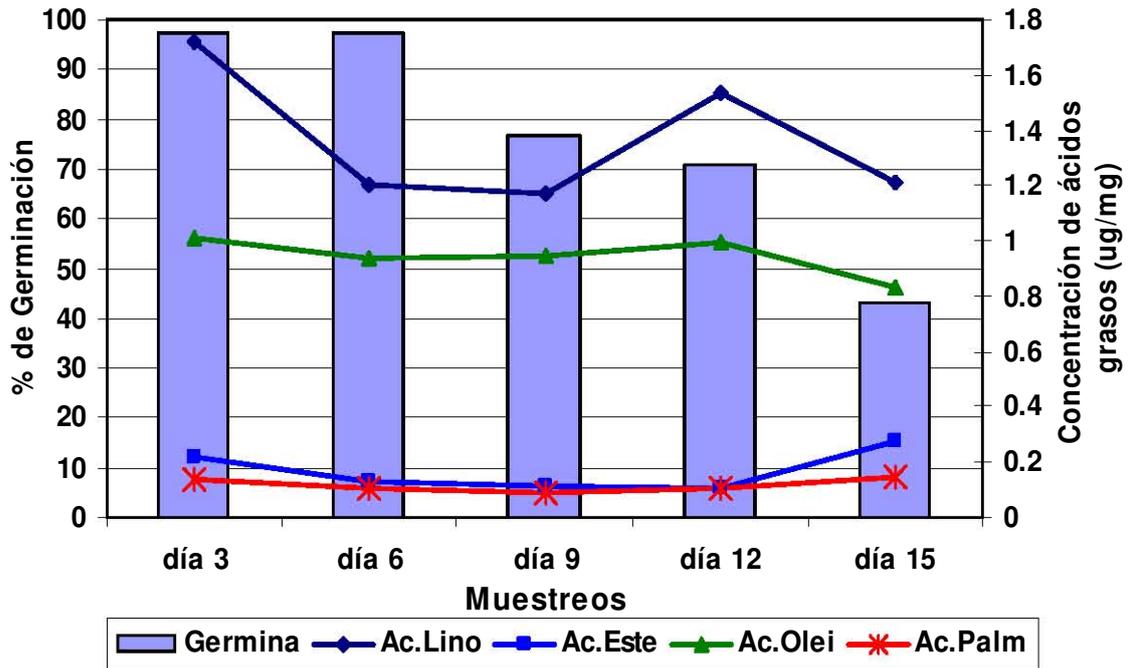
P. hollianus (65%/45°C)



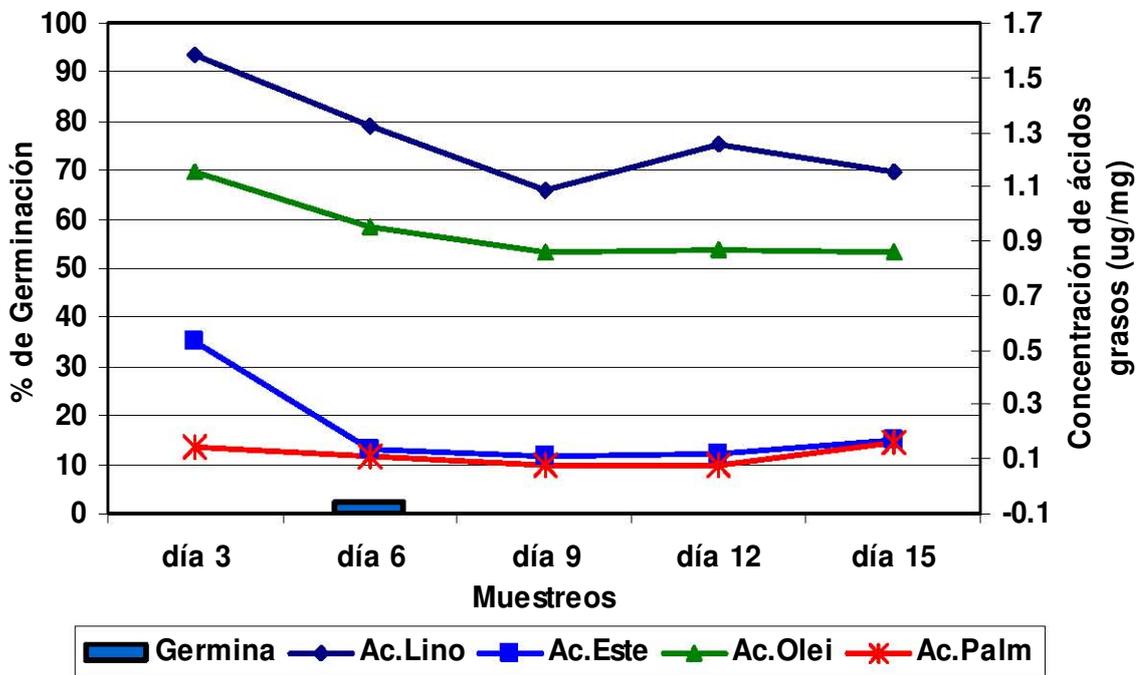
P. hollianus (65%/55°C)



P. hollianus (75%/45°C)



P. hollianus (75%/55°C)



APÉNDICE “C”

Sección I

Análisis de varianza de dos factores correspondiente al porcentaje de germinación de semillas de *Pachycereus hollianus* y los tratamientos de envejecimiento acelerado (temperatura vs. humedad relativa, durante 15 días con registro cada 3 días) posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado.

$$H_0: X_1=X_2=X_3\dots \quad H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3\dots$$

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA GERMINACIÓN						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5878.633333	2	2939.31667	4.99052347	0.01026231	3.16824597
Dentro del grupo	31804.9	54	588.97963			
Total	86636.98333	59				

Dado que la F experimental es mayor que la F de tablas se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto hay diferencia significativa entre el tiempo de envejecimiento reflejado en porcentaje de germinación y los tratamientos empleados.

Sección II

Análisis de varianza de dos factores correspondiente a la concentración del ácido linoleico y los tratamientos empleados en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (temperatura vs. humedad relativa, durante 15 días con registro cada 3 días).

$$H_0: X_1=X_2=X_3\dots \quad H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3\dots$$

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL ÁCIDO LINOLEICO						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Interacción	0.01921808	2	0.00960904	0.30769594	0.73641911	3.16824597
Dentro del grupo	1.68636629	54	0.03122901			
Total	1.91243054	59				

Dado que la F calculada es menor a la F de tablas se acepta la hipótesis

alternativa, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre la temperatura y la humedad relativa de los tratamientos.

Sección III

Análisis de varianza de dos factores corresponde a la concentración del ácido oleico y los tratamientos empleados en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (temperatura vs. humedad relativa, durante 15 días con registro cada 3 días).

$$H_0: X_1=X_2=X_3\dots \quad H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3\dots$$

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL ÁCIDO OLEICO						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Interacción	0.00033378	2	0.00016689	0.01456878	0.9855407	3.16824597
Dentro del grupo	0.61858244	54	0.01145523			
Total	0.65197796	59				

Dado que la F calculada es menor a la F de tablas se acepta la hipótesis alternativa, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre la temperatura y la humedad relativa de los tratamientos.

Sección IV

Análisis de varianza de dos factores corresponde a la concentración del ácido esteárico y los tratamientos empleados en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (temperatura vs. humedad relativa, durante 15 días con registro cada 3 días) posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado.

$$H_0: X_1=X_2=X_3\dots \quad H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3\dots$$

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL ÁCIDO ESTEÁRICO						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Interacción	0.00907166	2	0.00453583	0.84546752	0.43496044	3.16824597
Dentro del grupo	0.28970325	54	0.00536487			
Total	0.30362918	59				

Dado que la F calculada es menor a la F de tablas se acepta la hipótesis

alternativa, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre la temperatura y la humedad relativa de los tratamientos.

Sección V

Análisis de varianza de dos factores corresponde a la concentración del ácido palmítico y los tratamientos empleados en semillas de *Pachycereus hollianus*, posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado (temperatura vs. humedad relativa, durante 15 días con registro cada 3 días) posterior al tratamiento de envejecimiento acelerado.

$$H_0: X_1=X_2=X_3\dots \quad H_a: X_1 \neq X_2 \neq X_3\dots$$

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL ÁCIDO PALMÍTICO						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Interacción	8.3278E-05	2	4.1639E-05	0.06651291	0.93572736	3.16824597
Dentro del grupo	0.03380572	54	0.00062603			
Total	0.03672256	59				

Dado que la F calculada es menor a la F de tablas se acepta la hipótesis alternativa, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre la temperatura y la humedad relativa de los tratamientos.

LITERATURA CITADA

- **Arbiza, M. J. 2003.** Las cactáceas, tesoro de nuestro país. Correo del Maestro Núm. 82, marzo 2003
- **Arias, S. 1993.** Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **XIIV**. Pp 109-115.
- **Arias, S. 1997.** Distribución, grupos taxonómicos y formas de vida. En: *Suculentas mexicanas, cactáceas.* cvs Publicaciones-conabio-unam-Semarnap, México.
- **Arias, T. A. A. 2000.** Las plantas de Zapotitlán Salinas, Puebla: un folleto de divulgación sobre botánica y conservación. Tesis Licenciatura. UNAM. Facultad de ciencias. 47 p.
- **Asakawa, T y Matsushita, S. 1980.** Coloring conditions of the thiobarbiyuric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids.* 15:137-140.
- **Bewley, J. D. y Black, M. 1994.** Seeds: physiology of development and germination. 2nd ed. New York (NY): Plenum Press. 445p.
- **Bravo-Hollis, H. 1978.** Las cactáceas de México. Vol I. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 654-658, 638-643.
- **Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1991.** Las cactáceas de México. Vol. III UNAM. México.
- **Buchvarov, P. y Gantcheff, T. 1984.** Influence of accelerated and natural aging on free radicals levels in soybean seeds. *Physiologia Plantarum.* 60: 53-56.
- **Cruz, H. J. P. 1997.** Otras Cactáceas de importancia económica en México, por su producción de frutos comestibles. Memorias de VII Congreso Nacional y V Internacional sobre conocimiento y aprovechamiento del Nopal. Monterrey, N.L. México. Pp. 70-80
- **Cuevas, S. J. A. 2000.** Semillas recalcitrantes: Importancia, Características y Alternativas para su Conservación. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. 3ra ed. Chapingo, México.
- **Covarrubias, O. J. P. 2005.** Plantas que cuidan el agua. INEGI Junio 2005.

- **Daniel, W. W. 2002.** Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed. Ed. Limusa, México. 755 p.
- **Dávila, A., Arias, S. y Guzmán, U. 2001.** *Lista taxonómica de Cactaceae en México.* FES Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-Conabio, proyecto Q045.
- **Dell'Aquila, A. 1994.** Wheat seed ageing and embryo protein degradation. *Seed Science Research.* 4: 293-298.
- **Delouche, J. C. 2002.** Germinación, deterioro y vigor de semillas. Seed news. Mississippi State University. EUA.
- **Donald, W. W. y Zimdahl. R. L. 1987.** Persistence, germinability, and distribution of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) seed in soil. *Weed Sci.* 35:149-154.
- **Francis, A. y Coolbear, P. 1988.** Changes in the fatty acid content of the polar lipid fraction of tomato seeds induced by ageing and/or subsequent low temperature pre-sowing treatment. *Seed Science and Technology.* 16: 87-95.
- **Flores, J. 2001.** Plant life-form and germination in a Mexican inter-tropical desert: effects of soil water potential and temperature. *Journal of Arid Environments.* 47: 485-497.
- **Flores, O. C. M; Peñalosa, C. I; Hernández, P. L. B; Dávila, A. P. D y Arizmendi, M. C. 2003.** Carbohydrate Analysis of Floral Nectar Using Medium Infrared. *Phytochem. Anal.* 14: 319-324.
- **Flores-Ortiz, C. M. 2004.** Quimiotaxonomía del Género *Neobuxbaumia*. Tesis de Doctorado en Ciencias, UNAM. México. 112 p.
- **García, E. 1997.** Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. UNAM. México. 217 p.
- **Gidrol, X., Serghini, H., Noubhani, A., Mocouot, B y Mazliak. 1989.** Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiologia Plantarum.* 76: 591-597
- **Gilpin, M. E. 1987.** Spatial structure and population vulnerability. In *Viable populations for conservation* (M.E. Soulé ed.). Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 125-139

- **Godínez-Álvarez, H. y Valiente-Baunet, A. 1998.** Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Environments*. 39: 21-31.
- **Golovina, E., Tikhonov, A. y Hoekstra, F. 1997.** An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane-permeability changes with seed aging. *Plant Physiology*. 114: 383-389.
- **Gómez, R. J. F. 2000.** Envejecimiento. *Revista de Posgrado de la Cátedra VIa Medicina*. 100: 21-23.
- **Guzmán, U., Arias, S. y Dávila, P. 2003.** Catálogo de Cactáceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 315 p.
- **Harman, G. y Mattick, L. 1976.** Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Science*. 206: 323-324.
- **Halstones, M. y Smith, M. 1988.** Lipid peroxidation in relation to decline vigour in seeds of soya (*Glycine max* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Plant Physiology*. 133: 452-456.
- **Halliwel, B. y Gutteridge, J. 1984.** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*. 23: 1396-1397.
- **Hendry, G. 1993.** Oxygen, free radical process and seed longevity. *Seed Science Research*. 3: 141-153.
- **Hendry G. 1997.** Free radical in seeds-moving the debate forward. En: Ellis R., Black M., Murdoch A., Hong T. (Eds.). *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Academic Publishers. GB. Pp 657-663.
- **Hepburn H., Goodman, B., McPhail, D., Matthews, S. y Powell, A. 1986.** An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. *Journal of Experimental Botany*. 37: 1675-1684.
- **Hunt, D.R. (comp.) 1999.** CITES Cactaceae Checklist. 2^a. ed. Royal Botanic Gardens, Kew y I.O.S. Milborne Port.
- **Khan, M., Hendry, G., Atherton, N. y Vertucci-Walters, C. 1996.** Free radical and lipid accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly

aged soybean seeds: a light-promoted process. *Seed Science Research*. 6: 101-107.

- **Lohengrin A. C. 1999.** Bancos de semillas persistentes: modelos de germinación retardada y su aplicación en ambientes alpinos. *Revista Chilena de Historia Natural*. 72: 457-466.
- **Lozada V. Y. 2005.** Peroxidación de ácidos grasos de semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* en condiciones de almacenamiento a largo plazo. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. 51 p.
- **Mead, J. 1980.** Membrane lipid peroxidation and its prevention. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 57: 393-397.
- **Morrison, W. R. y Smith, L.M. 1964.** Preparation of fatty acid methyl ester and dimethylacetals from lipids with Boron Fluoride-methanol. *Journal of Lipids Research*. 5: 600-608.
- **Munck, L., Pram, N., Moller, B., Jacobsen, S., Sondergaard, I., Engelsen, S., Norgaard, L. y Bro, R. 2001.** Exploring the phenotypic expression of a regulatory proteome-altering gene by spectroscopy and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. 446: 171-186.
- **Nevares-Ibarra, S. M., Zavala, P.A. Sánchez-Mendoza, I.R. y Márquez, S.G. 2000.** Germinación y propagación de la biznaga (*Ferocactus herrerae*) en condiciones *in vitro*. En Simposio Internacional sobre el Cultivo y aprovechamiento de la pitaya (*Stenocereus*) y la pitahaya (*Hylocereus* y *Selenicereus*), Guadalajara Jalisco.
- **Ohlrogge, J. y Kernan, T. 1982.** Oxygen-dependent aging of seeds. *Plant Physiology*. 70: 791-794.
- **Olfield, S. 1997.** *Cactus and succulent plants. Status survey and conservation action plan*. iucn/ssc Cactus and Succulent Specialist Group. iucn, Gland.
- **Pérez-Vich, B., Velasco, L. y Fernández-Martínez, J. 1998.** Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 5: 547-555.

- **Powell, A. y Harman, G. 1985.** Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. *Seed Science and Technology*. 13: 659-667.
- **Priestley, D. y Leopold, C. 1979.** Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology*. 63: 726-729.
- **Priestley, D. Werner, B. Leopold, C. y McBride, M. 1985.** Organical free radical levels in seeds and pollen: The effects of hydration and aging. *Physiology Plantarum*. 64: 88-94.
- **Priestley, D. 1986.** Seed Aging. Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil. Cornell University Press. USA. Pp 17-18.
- **Pucacka, S. 1991.** Changes in membrane fatty acid composition during desiccation of seeds of silver maple. *Seed Science and Technology*. 26: 535-540.
- **Reyes, S. J., Brachet, I. C., Pérez, C. J. y Gutiérrez, de la R. A. 2004.** Cactáceas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca. México.
- **Roberts, E. y Ellis R. 1989.** Water and seed survival. *Annals of Botany*. 63: 39-52.
- **Robertson, J. y Barton, F. 1984.** Oil and water analysis of sunflower seed by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 61: 543-547.
- **Rodríguez A. I.; Lira S. R.; Campos C. J. y Casas F. A. 2002.** Diversidad morfológica y genética de *Pachycereus hollianus* (F.A.C. Weber) Buxb., especie en proceso de domesticación en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Informe UBIPRO 2002, FES Iztacala.
- **Sacandé, M. Buitink, J. y Hoestra, F. 2000.** A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex behavior. *Journal of Experimental Botany*. 51: 635-643.
- **Shanklin, J y Edgar, B. 1998.** Desaturation and related modifications of fatty acid. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* 49:611-641
- **Shenk, J. y Westerhaus, M. 1993.** Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Infracsoft International. Port Matilda. 116 p.

- **Jeng, T. L. y Sung, J. M. 1994.** Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiol. Plant.* 91: 51-55.
- **Stewart, R. y Bewley. P. 1980.** Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology.* 65: 245-248.
- **Stuart, B. y Ando, D. 1997.** Biological Applications of Infrared Spectroscopy. ACOL (University of Greenwich).
- **Velasco, L., Fernández-Martínez, J. y De Haro, A. 1997.** Determination of the fatty acid composition of the oil in intact-seed mustard by near-infrared reflectance spectroscopy. *American Oil Chemists' Society.* 74: 1595-1602.
- **Velasco, L., Matthäus, B. y Möllers, C. 1998.** Nondestructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: I. Analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science.* 38: 1645-1650.
- **Velasco, L., Möllers, C. y Becker, H. 1999.** Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica.* 106: 79-85.
- **Velasco, L. y Möllers, C. 2002.** Nondestructive assessment of protein content in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica* 123: 89-93.
- **Vergara, M. L. F. 2002.** Inducción de envejecimiento artificial en semillas de *Stenocereus stellatus* y *Brassica napus* L. y su posible relación con la peroxidación de ácidos grasos. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. 47 p.
- **Walters, C y Ross, E. 1993.** Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research.* 3: 201-213
- **Wilson, D. y Mc-Donald, M. 1986.** The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Science and Technology.* 14: 269-300.
- **Ybarra, G. 2003.** Contrabando del Cactus, Cosecha Legal. Una amenaza creciente a los Cactus del Desierto Chihuahuense Boletín de Prensa. Sonora, México.
- **Zavaleta, P. M. 2003.** Relación entre los niveles de ácidos grasos insaturados y la viabilidad en semillas de *Hechtia podantha* y *Beaucarena*

gracilis durante el envejecimiento acelerado. Tesis Licenciatura. UNAM, México. 47 p.

- **Zentella, P. M., y Saldaña, B. Y. 1996.** Papel Fisiológico de los radicales libres. Biol. Educ. Bioq (México). 15 (4): 152-161.
- **Zimdahl, R. L. 2003.** "The mission of land grant colleges of agriculture," American Journal of Alternative Agriculture. 18 (2): 107.