



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CIATEJ

Editoras:

Rosa María Camacho Ruiz

Antonia Gutiérrez Mora

Anne Christine Gschaedler Mathis

LOS AGAVES Y SUS DERIVADOS

*TENDENCIAS CIENTÍFICAS,
USO SOSTENIBLE Y PATRIMONIO*

**LOS AGAVES Y SUS DERIVADOS:
TENDENCIAS CIENTÍFICAS, USO SOSTENIBLE Y PATRIMONIO**

LOS AGAVES Y SUS DERIVADOS: TENDENCIAS CIENTÍFICAS, USO SOSTENIBLE Y PATRIMONIO

Rosa María Camacho Ruiz
Antonia Gutiérrez Mora
Anne Christine Gschaedler Mathis
Editoras



Agave y derivados: Tendencias científicas, uso sostenible y patrimonio

Primera edición: 2023

Diseño editorial: José Enrique Rentería Méndez

Diseño de portada: Nayeli Vallarta

© Por la edición: Rosa María Camacho Ruiz,
Antonia Gutierrez Mora, Anne Christine Gschaedler Mathis

© Todos los textos son propiedad de sus autores

D. R. © Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco A.C.
Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, 44270 Guadalajara, Jal.

ISBN: 978-607-8734-56-6

Impreso y hecho en México

ÍNDICE

Introducción.....	9
Prefacio.....	11
1. Tendencias científicas sobre la biología del agave.....	19
1.1 Aspectos relevantes del desarrollo sexual en el género <i>Agave</i> y otras asparagáceas.....	21
1.2 Micropropagación de <i>Agave</i> spp. Mediante proliferación de yemas axilares en sistemas de inmersión temporal.....	53
1.3 Avances en la criobioteología de <i>Agave</i> spp.....	69
1.4 Propagación <i>in vitro</i> de <i>Agave potatorum</i> (tobalá) mediante organogénesis axilar y callogénesis en medio sólido.....	79
1.5 Anatomía, composición química y genómica de las fibras de <i>Agave</i> spp.....	93
1.6 <i>Syphoborus acupunctatus</i> Gyllenhal plaga de los magueyes en México.....	111
2. Ciencia y tecnología de bebidas de agave.....	131
2.1 Análisis de la diversidad microbiana y su inferencia funcional durante el proceso de fermentación del pulque para la definición de un microbioma central de esa bebida.....	133
2.2 Determinación de la sucesión de las comunidades de levaduras y de los cambios fisicoquímicos en la producción de pulque comercial en la hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, México.....	147
2.3 Caracterización metagenómica y evaluación de compuestos volátiles en fermentaciones de mezcal del estado de Oaxaca.....	165
2.4 Caracterización sensorial del mezcal: desde los aromas hasta las preferencias.....	181
2.5 Huella espectral de bebidas destiladas de agave mediante espectroscopia de infrarrojo.....	199
2.6 Comparación de cinco procesos fermentativos para la elaboración de comiteco.....	209

3. Fructanos y otros derivados del agave.....	219
3.1 Proceso de ultrafiltración de fructanos de agave: <i>fouling</i> ensuciamiento de membranas de cerámica.....	221
3.2 Efecto de mezclas de fructanos lineales y ramificados sobre la apoptosis <i>in vitro</i> en células de colon.....	233
3.3 Cinética de liberación de curcumina en microencapsulados de alginato con agavinas y material lignocelulósico.....	245
3.4 Encapsulación de <i>Saccharomyces boulardii</i> con agavinas: un nuevo enfoque del uso de biomateriales de <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	257
3.5 Obtención de saponinas de <i>Agave angustifolia</i> Haw por extracción asisitida por microondas.....	277
4. Aprovechamiento integral y sostenible de los agaves y sus subproductos.....	287
4.1 Materiales compuestos de matriz polimérica con refuerzo celulósico: una alternativa de alto valor agregado para los agaves.....	289
4.2 Pruebas morfológicas y mecánicas de biocompositos de PLA/ fibras de agave fabricados mediante MDF.....	303
4.3 Producción de etanol lignocelulósico a partir de bagazo de agave: un caso de estudio a nivel piloto.....	317
4.4 Valorización de bagazo de agave mediante la creación de biorrefinerías.....	337
4.5 Evaluación preliminar de los residuos líquidos agroindustriales de <i>Agave fourcroydes</i> Lem. como prebiótico.....	355
4.6 Capacidad espumante de extractos del guishe de <i>Agave lechuguilla</i>	367
5. Aspectos socioculturales del agave: normatividad y patrimonio.....	379
5.1 Proyecto LAM: una alternativa para la conservación de agaves regionales de Oaxaca.....	381
5.2 Resiliencia sociocultural en El Alto Mezquital, Hidalgo: el maguey como símbolo de identidad y subsistencia.....	397
5.3 Perspectivas y limitaciones del sistema agroforestal del agave llamado metepantle.....	417

INTRODUCCIÓN

El conocimiento en torno a los agaves tiene una larga historia, desde tiempos ancestrales el hombre ha establecido una relación con los agaves; en particular en México, donde existe la mayor diversidad de especies. El aprovechamiento de los agaves en México sigue vigente en muchas comunidades, ejemplos de ello son el pulque, el aguamiel, los mixiotes, el mezcal, los dulces tradicionales. Estos ejemplos de aprovechamiento de los agaves representan conocimiento generado y resguardado a lo largo del tiempo, son también patrimonio intangible de los mexicanos, aportando identidad y tradición a muchas comunidades.

De los agaves se obtiene comida, bebida, vestido y sustento, siendo de vital importancia acompañar su aprovechamiento con su cuidado. Existen muchos ejemplos de su uso sostenible a través del manejo agroforestal, por ejemplo, el metepantle que diversifica el uso del suelo y al mismo tiempo genera un ecosistema que permite al agave y otras plantas ser exitosas en su cultivo, aprovechamiento y conservación. Sin embargo, el aprovechamiento de los agaves ha sufrido, en algunos casos, una evolución enfocada a la industrialización, ejemplo de ello es el *Agave tequilana*, que ha sido aprovechado para la obtención de tequila y se produce en monocultivo sin permitir a la planta su reproducción por semilla limitando con esto la diversidad genética. La reproducción masiva de clones de *Agave tequilana* implica nuevos retos en su cultivo, aprovechamiento y conservación como son: plagas, enfermedades y una incapacidad de hacer frente al cambio climático.

Este libro aborda la problemática del aprovechamiento sostenible de los agaves desde diversos enfoques, por un lado, una mirada científica para comprender la biología de los agaves, su manera de reproducirse, la composición bioquímica de la planta, el aprovechamiento de sus moléculas, los detalles en su reproducción *in vitro*, el manejo y aprovechamiento de residuos generados por la industria. Aborda también el estudio de bebidas de agave tradicionales como el pulque, mezcal y comiteco, estudiando la diversidad de microorganismos que participan en el proceso fermentativo. La obra se enfoca también en

Introducción

analizar el estado actual del manejo agroforestal de los agaves que sigue haciéndose en algunas comunidades, plantea una propuesta de recuperación de manejo en el esquema de metepantle. Por otro lado, muestra ejemplos actuales exitosos de la conservación de la diversidad de agaves y presenta a los agaves como forma de vida de las comunidades. Esperamos que el lector encuentre en esta obra datos que informen sobre la ciencia detrás de los agaves y a la vez haga evidente la importancia de conservar la diversidad de agaves, dejarlos florecer para abonar a la diversidad genética, promover la conservación de las semillas, pero, sobre todo, que inspire a los lectores para trabajar en la conservación del patrimonio asociado a los agaves, la riqueza cultural, el conocimiento ancestral y el manejo agroforestal.

Rosa María Camacho Ruiz
Biotecnología Industrial
CIATEJ
rcamacho@ciatej.mx

PREFACIO

Los agaves, la verdadera planta de las maravillas

Pensemos en un maguey. Para los mexicanos, los magueyes son la esencia de nuestro país, pero tal vez por eso rara vez se nos ocurre que realmente son plantas muy raras. No son un árbol, aunque viven muchos años, y a veces pueden tener tallos leñosos. No son un arbusto ni son una hierba. ¿Entonces que son?

Los botánicos consideramos a los magueyes como plantas “rosotófilas”, o sea que crecen como una roseta, donde todas las hojas se van produciendo a partir del centro y se ordenan alrededor de este. Son plantas suculentas, lo cual quiere decir que en sus gruesas hojas guardan mucha agua, esto les permite sobrevivir a la sequía gracias al agua acumulada y a que presentan un tipo particular de fotosíntesis que solo muestran este tipo de plantas, en donde los estomas de las hojas se abren en la noche (cuando hace menos calor) y se pierde menos agua, para permitir la entrada del bióxido de carbono (CO₂) a la hoja y realizar la fotosíntesis. Esta adaptación a la sequía es una de las maravillas biológicas que presentan los agaves.

Los agaves viven muchos años —entre 7 y 30 o más— dependiendo de la especie y las condiciones del lugar donde crecen. Al final de su vida los agaves hacen una cosa sorprendente: producen una sola inflorescencia gigante, que a veces llamamos quiote o escapo. Esta inflorescencia puede llegar a medir hasta 16 metros o más, y es la inflorescencia más grande del mundo vegetal. La inflorescencia produce cientos de flores, que juntas producen a veces hasta litros de néctar por noche, y muchísimo polen. Este esfuerzo reproductivo masivo tiene una gran recompensa para la planta: las flores son visitadas y polinizadas por diferentes animales voladores (desde pequeñas abejas y avispa, hasta los murciélagos nectarívoros, principalmente del género *Leptonycteris* y muchos otros animales, tanto vertebrados como colibríes y otras aves e invertebrados como diferentes polillas), que buscan el polen y el néctar como alimento. Los agaves generalmente producen miles de semillas, de forma negra y triangular. Invito a

las/los lectores a empujar con ganas una inflorescencia madura de agave –que se distinguen por tener los frutos ya secos y abiertos– y les van a caer en la cabeza cientos de semillas –mismas que pueden ser difíciles de sacar de su pelo–, pero vale la pena la experiencia. Pueden germinar estas semillas y tener plantas de agave bebés en poco tiempo. Este esfuerzo reproductivo masivo tiene un costo, y las rosetas mueren poco después, es decir, es una reproducción suicida.

Pero que no se entristezcan las/los lectores. Por un lado, nuestro agave seguramente dejó miles de semillas que van a producir una nueva y vigorosa generación de plantas, ricas en variación genética. Por otro lado, muchos agaves “hacen trampa” y aunque se muere la roseta adulta, en la base o cerca de ella, por rizomas, dejan gran cantidad de pequeñas y medianas rosetas que tienen su mismo genotipo y crecen rápido (todos son una clona). En ciertos agaves también se pueden producir estos hijuelos en el lugar de las flores que no fueron polinizadas o en el tallo de la inflorescencia. Esta floración masiva y la polinización por murciélagos es otra de las maravillas de los agaves.

Por otra parte, los agaves son importantes para México desde un punto de vista ecológico, ya que dominan grandes extensiones de nuestros paisajes, regiones que se encuentran principal, pero no exclusivamente, en las zonas más secas y semiáridas del país. Existen magueyes en casi todo México –excepto en los bosques tropicales más húmedos–. Además de ser abundantes, son muy importantes ecológicamente, ya que representan lo que se ha llamado especies clave: especies que si se perdieran (extinguieran) en un ambiente dado, cambiaría toda la comunidad biológica, especialmente por la gran cantidad de animales que se alimentan de su néctar y su polen, pero también porque que se reproducen cuando no existen otras fuentes de agua y alimento en el ecosistema. Estos animales pueden ser polinizadores importantes de diferentes plantas. Por ejemplo, los murciélagos del género *Leptonycteris*, que además polinizan muchas otras especies ecológicamente importantes como son los cactus columnares, diferentes leguminosas, ceibas y otras bombacoideas o al árbol de los guajes (*Crescentia spp.*), etc.

Y no debemos olvidar que los antiguos mexicanos, tanto en Mesoamérica como en Aridoamérica, dependieron desde el principio de los agaves para todas sus necesidades: para bebidas no alcohólicas, como el aguamiel y para bebidas alcohólicas, como el pulque. El agave cocido, especialmente la cabeza o piñas maduras, se consumieron desde muy temprano por los humanos en México y el Suroeste de los Estados Unidos para utilizarlo como fuente de carbohidratos. Las plantas de agave, como bien se sabe, producen fibras muy resistentes, cuya calidad, dureza y largo depende de la especie de agave, fueron y aún siguen siendo utilizadas para producir telas, cuerdas, cepillos, redes, etc. Otros agaves se han utilizado como fuentes de saponinas, para usarse como jabones y otros compuestos con funciones medicinales.

Además, para el México moderno, los agaves son muy importantes para la economía del país por la gran cantidad de divisas que entran debido a la venta internacional y nacional de tequila y mezcales. El pulque sigue siendo de interés local, y se siguen utilizando agaves para producir fibras y compuestos químicos, además existe mucho interés por su potencial biotecnológico y para producir biocombustibles.

Para los biólogos como yo, los agaves son fuente de fascinación, ya que son ejemplo de la acción de la selección natural, al generar las adaptaciones que se mencionaron arriba –su fisiología que les permite vivir en los lugares más secos del país y por su espectacular y suicida biología reproductiva y polinización– como por su gran diversidad. Aún no sabemos el número total de especies de agave que existen en México o en el mundo (la mayoría solo se encuentran en nuestro país), pero sin lugar a duda son más de 200. Todos los años se descubren nuevas especies y, por otra parte, se ha encontrado que los linajes herbáceos cercanos a ellos, como son los amoles (el género *Manfreda*) y los nardos (el género *Polianthes*), son parte evolutiva del género *Agave*, y que junto con ellos son uno de los ejemplos más notables en el mundo vegetal de lo que se conoce como una radiación adaptativa, donde de una sola especie original ancestral, por selección natural, han evolucionado, en relativamente poco tiempo (unos 6 millones de años), cerca de 250 especies.

Las ventajas evolutivas que presentaba el agave ancestral y que dieron origen a su espectacular radiación seguramente tiene que ver con sus adaptaciones a la sequía, su eficiente reproducción y posteriores adaptaciones particulares a todos los tipos de climas y de suelo que existen en México y en los países e islas vecinas. Pero en particular creemos que esta radiación evolutiva se debe a un proceso evolutivo llamado *coevolución*, donde los agaves se fueron adaptando a sus polinizadores, produciendo cada vez inflorescencias más grandes, eventualmente gigantes, néctar muy abundante (principalmente en la noche), producción nocturna de polen y colores y formas atractivas para sus murciélagos polinizadores. Como parte del proceso coevolutivo, estos murciélagos evolucionaron, especieron (aunque son muchas menos especies, que los agaves, sólo son tres especies de *Leptonycteris*) y se adaptaron para alimentarse y vivir solo de néctar y polen, para tener un vuelo estacionario (como helicópteros) similar al de los colibríes y alargaron su cráneo (para visitar mejor las flores), reduciendo su dentición y aumentando el largo de su lengua, adaptándola para extraer de forma eficiente el néctar de las flores de agave.

Como mencionamos antes, el uso y cultivo de los agaves está en un verdadero auge. En este momento todos los mexicanos somos expertos en mezcales y tequilas, y cada una de nosotras/nosotros tenemos nuestras especies mezcaleras favoritas, marcas y formas de tomarlos. El consumo de pulque ha experimentado un renacimiento entre la juventud. Además, los agaves son una verdadera fábrica de compuestos químicos importantes e intrigantes, y existe mucho interés en entender su química, sus compuestos, sus posibles usos y avanzar en el estudio de su transcriptoma, genoma, proteoma, metaboloma, etc. y la fermentación de sus productos.

En la extensa colección de artículos que se incluye en este libro, sus 27 capítulos revisan diversos tópicos alrededor de nuestras plantas, las cuales están siendo estudiadas por diferentes grupos de investigadores en México, interesados en seguir explorando y revelando las maravillas y secretos de los agaves.

Diversas complejidades y aspectos únicos de la biología reproductiva del género *Agave* son revisados por Alejandra G. González-Gutiérrez y colaboradores con un énfasis en la morfología y anatomía

de la producción del polen y óvulos en el género *Agave* y su doble fertilización, describiendo las particularidades del cariotipo del género, que presenta cromosomas grandes y chicos. Otros aspectos más ecológicos de su reproducción y polinización son descritos por Matías Domínguez-Laso y Graciela C. Ángeles Carreño en Oaxaca, en un importante proyecto de educación y ciencia ciudadana.

Los magueyes siguen siendo utilizados de manera tradicional en diferentes lugares del país, como la población hñähñu (conocidos como otomíes) en el Alto Mezquital, Hidalgo, capítulo que presentan Doris Arianna Leyva-Trinidad y sus colegas. Las posibilidades de emplear de manera rentable el sistema tradicional de sembrar agaves junto con otros cultivos lo describe con entusiasmo Gustavo Viniegra-González y sus colaboradores, concluyendo que “el sistema agrícola del metepantle [sistema tradicional conformado por camellones de milpas entre hileras de agaves], no sólo es un patrimonio cultural de México, también puede convertirse en una nueva fuente de riqueza para una gran parte de los campesinos de las regiones semiáridas del país”. Pero no todo es felicidad. Actualmente los agaves cultivados de México sufren importantes enfermedades y plagas, destacando el escarabajo “picudo del agave” (*Sycphophorus acupunctatus*), aunque Héctor González Hernández menciona estrategias biológicas prometedoras para su control, como son trampas con hormonas.

Si bien los agaves silvestres producen gran cantidad de semillas y muchos hijuelos clonales, por diferentes razones muchas veces los productores prefieren tener plantas con un solo genotipo propagado por medio de cultivo de tejidos, especialmente para poder sembrar y cosechar grandes extensiones, ya que los agaves no producen suficientes hijuelos de forma natural, aunque la clonación hace al cultivo susceptible a enfermedades al no tener variación genética y se pueden acumular mutaciones somáticas que van a reducir la productividad del cultivo. La propagación clonal ha sido extensamente utilizada en el agave tequilero. Marlene I. Ortiz-Mena y colaboradores describen una forma de cultivo de tejido en agaves que llaman Sistemas de Inmersión Temporal. En otra contribución, Enrique Rodríguez de la Garza y colegas presentan avances en el cultivo de tejidos del agave del mezcal tobalá, *A. pota-*

torum que, de forma natural, no produce hijuelos y sólo se propaga por semilla. Las semillas de los agaves generalmente pueden mantenerse viables si se les almacena en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, pero en las plantas comerciales o clonales puede ser difícil su preservación. Lourdes Delgado-Aceves y colaboradores nos ilustran en cómo mantener en nitrógeno líquido meristemos apicales y embriones somáticos en *Agave peacockii* y *A. tequilana* cv. 'Chato'.

Como se mencionó arriba, los agaves siguen siendo importantes para producir fibras. En su contribución, Dalía C. Morán-Velázquez y sus colegas mencionan 66 especies de agave donde se ha reportado el uso de sus fibras, y describe la anatomía y las características de estas, incluyendo química y aspectos de su genómica, en particular de los genes ortólogos codificantes para la enzima Celulosa Sintasa. En otro capítulo, Pedro Jesús Herrera Franco y Alex Valadez González nos platican del uso de las fibras henequén, *A. fourcroydes* como agente de refuerzo para la elaboración de materiales compuestos, en particular para construir casas. Las fibras de agave también son utilizadas por Tania Diaz Vidal y colaboradores en diferentes posibles aplicaciones en la técnica de modelado por deposición fundida.

En este momento, gracias a la facilidad con la que se pueden secuenciar el gene 16S y la región ITS en bacterias y hongos, respectivamente, ha habido una proliferación en los estudios que describen a las comunidades involucradas en diferentes tipos de fermentaciones. Dos estudios analizan las comunidades microbianas en el pulque de *A. salmiana*, uno en Hutilzlac, Morelos, por Fernando Astudillo Melgar et al., y otro en Tlaxco, Tlaxcala, por Rodrigo Arredondo Fernández, y colegas, aunque en el segundo usaron métodos tradicionales (bioquímicos) para identificar a las levaduras. Estas diversas comunidades microbianas también fueron analizadas en el mezcal de *A. americana* var. *oaxacensis* y de *A. angustifolia* por René Quezada Romero y su grupo de trabajo. Alma G. Verdugo-Valdez y colaboradores describen las comunidades de levaduras (cultivadas e identificadas con métodos tradicionales) en la elaboración de licor llamado “comiteco” de Chiapas, donde se emplea *A. americana*.

Sobre el mezcal, Sergio Erick García Barrón describe estudios sobre sus aromas, compuestos químicos y preferencias de los consumidores, mientras que Diana N. Regla Corona y colaboradores utilizaron marcadores espectrales en infrarrojo para buscar diferencias entre tequila, mezcal, bacanora (un tipo de mezcal que se produce en Sonora) y sotol (una bebida análoga al mezcal, pero derivada de otras plantas del desierto, el género *Dasyliirion*).

En temas de biotecnología más pura, existe mucho interés en el uso de fructanos, también conocidos como inulinas del agave, que son polímeros complejos derivados de la fructosa. Noé Luiz-Santos y colegas describen métodos de ultrafiltración para separarlos por peso molecular. El posible uso de estos compuestos en tratamientos contra el cáncer se describe en el capítulo por Paola Álvarez García y colegas, y el uso de encapsulados usando estos compuestos para la curcumina y para un probiótico (*Saccharomyces boulardii*) los describen las contribuciones de Carolina Buitrago Arias et al. y de Liliana Kelly Vigil Cuate et al, respectivamente.

El *boom* de producción de tequila y mezcal implica la generación de gran cantidad de residuos, mismos que tienen posibles usos. El empleo del bagazo de agave, principalmente para producir etanol y diferentes combustibles como hidrógeno y otros gases, los describen respectivamente José García-Béjar y sus colaboradores y Jacobo Pérez-Barragán. El posible uso de residuos líquidos agroindustriales del henequén como prebiótico lo analizan Ángeles Sánchez-Contreras *et al.*

Por último, la producción de saponinas de los residuos de la producción de fibra en *A. lechuguilla* es presentado por Lorena Vargas Rodríguez, mientras que Adriana Madrazo Rojas y colaboradores analizan la extracción de saponinas de *A. angustifolia* utilizando microondas.

Así, esta extensa colección nos muestra parte del auge y el estado del arte en la investigación y usos de los agaves en México, que además nos ilustra porqué el género es la verdadera planta de las maravillas.

Luis E. Eguiarte
Instituto de Ecología, Departamento de Ecología Evolutiva
Universidad Nacional Autónoma de México
fruns@unam.mx

1.-Tendencias científicas sobre la biología del agave



1.1 Aspectos relevantes del desarrollo sexual en el género *Agave* y otras asparagáceas

Alejandra G. González-Gutiérrez^{1,#}, Benjamín Rodríguez-Garay^{1,#},
Jorge Verdín²

RESUMEN

El género *Agave* pertenece a la familia Asparagaceae, dentro de la cual se incluyen otros géneros de importancia industrial y ornamental, como *Manfreda*, *Polianthes*, *Yucca* y *Prochnyanthes*. El conocimiento del desarrollo sexual de esta familia facilita el uso sustentable de sus especies, además de ser útil en su mejoramiento genético. El género *Agave* se caracteriza por tener un cariotipo diploide bimodal de $2n = 2x = 60$. Existen algunas especies con diferentes niveles de ploidía, como es el caso de *Agave cupreata* con $2n = 2x = 60$, $2n = 4x = 120$, $2n = 5x = 150$ y $2n = 6x = 180$ (estado de Guerrero, México) y *Agave fourcroydes* Lemaire ($5x=150$) y su ancestro silvestre *Agave angustifolia* Haworth ($6x=180$) (estado de Yucatán, México). Las flores del género son protándricas con ovario trilocular ínfero y seis filamentos con anteras. El gametofito masculino (polen) se produce mediante meiosis con dos divisiones sucesivas que resultan en una tétrada tetragonal de cuatro microsporas que darán lugar a cuatro granos de polen. El gametofito femenino del *Agave* es considerado Monospórico del tipo Polygonum. En su madurez, el saco embrionario está compuesto de siete células. Durante la doble fertilización, la célula huevo dará lugar

¹ Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, Zapopan, JAL, México 45019.

² Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Camino Arenero 1227, Zapopan, JAL, México 45019.

*agavero01@hotmail.com.

Benjamín Rodríguez-Garay y Alejandra G. González-Gutiérrez actualmente son investigador jubilado y ex-alumna del CIATEJ, respectivamente.

al embrión, mientras que una célula central, particularmente grande y con el núcleo con polaridad invertida, formará el endospermo de la semilla. La doble fertilización, al igual que en otras especies vegetales modelo, es facilitada por iones de calcio, F-actina y miosina; sin embargo, en las Asparagáceas esos elementos han desarrollado estructuras alternativas que se adaptan a las peculiaridades de su saco embrionario. En este capítulo de revisión se detallan las similitudes del desarrollo sexual de las Asparagáceas con otras especies vegetales, pero también se describen sus particularidades.

PALABRAS CLAVE: Reproducción sexual, polen, saco embrionario, doble fertilización, Asparagaceae, gametogénesis.

Introducción

El conocimiento del proceso de desarrollo sexual de la familia Asparagaceae es importante ya que propicia el uso sustentable de sus especies y es útil para su mejoramiento genético. Además, las particularidades del desarrollo sexual de las asparagáceas amplían la frontera del conocimiento de la reproducción sexual vegetal. La reproducción sexual es una característica inherente a las angiospermas (plantas con flores), que introduce variabilidad genética mediante mecanismos de mutación y recombinación (Lei, 2010) en las poblaciones vegetales, lo que, en última instancia, les permite hacer frente a distintos factores bióticos y abióticos. En las flores, a través de la división meiótica, se producen los gametos masculinos y femeninos que se fusionan para dar lugar a un nuevo individuo (embrión) dentro de una semilla. Los orígenes de la división meiótica (para producción de gametos) no han sido dilucidados completamente (Wilkins y & Holliday, 2009; Colnaghi *et al.*, 2022). Sin embargo, en animales y plantas existen procesos en células somáticas parecidos a los de la división meiótica, -como el entrecruzamiento somático- que da como resultado las manchas gemelas, (*twin spots*), reportadas en las hojas de algodón (Barrow *et al.*, 1973), o las divisiones celulares en meristemos de raíz de cebolla

cultivados experimentalmente *in vitro* (células somáticas diploides), con prácticamente toda la ruta del proceso de la división meiótica hasta la obtención de las tétradas características del final de la meiosis (Barba-González, 2001). Todo lo anterior sugiere que esos procesos ya estaban presentes en un ancestro común.

En las Angiospermas, la formación de los gametos masculinos y femeninos es el resultado de los procesos consecutivos de esporogénesis y gametogénesis. Durante la esporogénesis una o varias células somáticas se diferencian del resto y, a través de meiosis, producen células haploides conocidas como microsporas (masculino) y megasporas (femenino). En la gametogénesis, estas esporas, mediante divisiones mitóticas, forman los gametofitos masculinos, también conocidos como granos de polen, y los femeninos, llamados sacos embrionarios, responsables de formar los gametos. Durante la reproducción sexual los gametos masculinos y femeninos participarán directamente en el proceso de fertilización para formar una semilla (She & Baroux, 2014). Los gametofitos masculinos y femeninos se producen en órganos específicos de la flor: el polen se desarrolla en los estambres (con anteras) y los sacos embrionarios en los pistilos (con ovario y óvulos) (Figura 1).

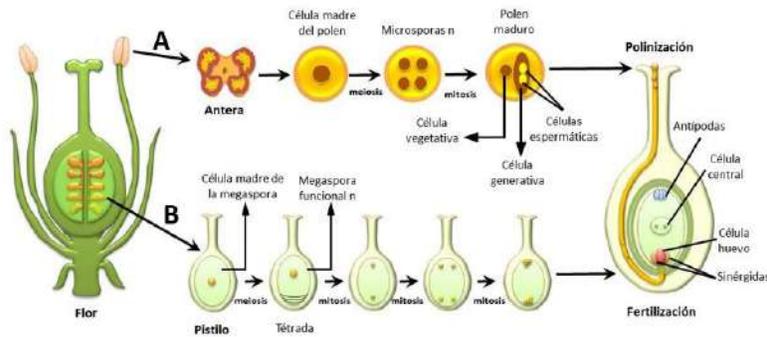


Figura 1. Desarrollo de los gametofitos en una flor hermafrodita similar a las flores del género *Agave*. **A)** Desarrollo del gametofito masculino. **B)** Desarrollo del gametofito femenino.

La reproducción sexual del género *Agave* inicia con la emisión de una inflorescencia comúnmente llamada “quiote”, que se origina en

el centro de la roseta. Esta inflorescencia consiste en un tallo espectacular que, en la madurez de la planta y dependiendo de la especie, llega a medir desde 2 hasta 12 m o más. Este tallo puede ser espigado o racemoso (subgénero *Littaea*) o paniculado (subgénero *Agave*), con flores en racimos umbelados en ramas laterales, aunque existen diversas formas intermedias entre los dos anteriores, según la especie (Gentry, 1982) (Figuras 2, 3 y 4A).

Figura 2. A) Planta paniculada de *Agave tequilana* Weber, Var. Azul. **B)** Panículas con flores. Mpio. Toluimán, Jalisco, México. Tomado de: Rodríguez-Garay (2017). <https://www.intechopen.com/chapters/55502>

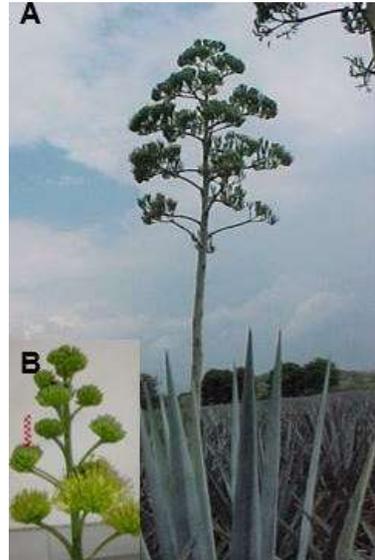


Figura 3. A) Planta racemosa de *Agave colimana*. **B)** Botones florales sobre tallo floral. Mpio. La Huerta, Jalisco, México. Tomado de: Rodríguez-Garay (2017). <https://www.intechopen.com/chapters/55502>

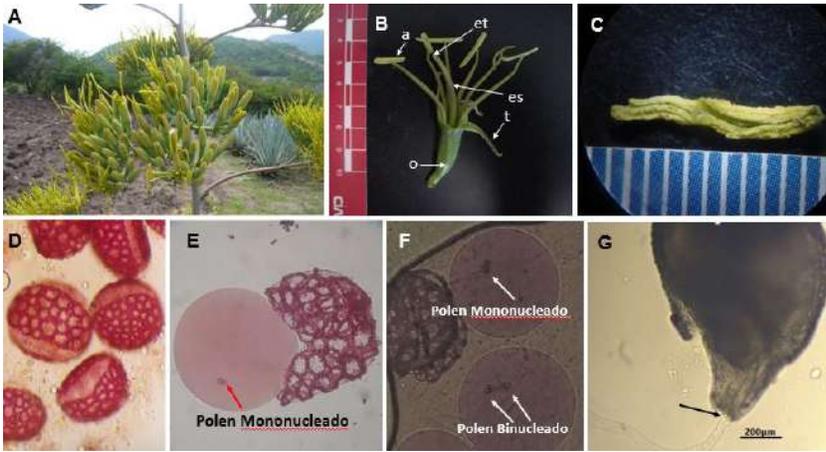


Figura 4. Partes de la flor del género *Agave*. **A)** Planta de *Agave angustifolia* (Oaxaca) en floración. **B)** Flor madura de *A. tequilana*. (a) antera, (o) ovario, (t) tépalo, (es) estilo, (et) estigma. **C)** Antera abierta de *A. tequilana* con polen maduro listo para polinizar. **D)** Granos de polen maduros de *A. tequilana*. **E)** Protoplasto de grano de polen de *A. tequilana* mononucleado. **F)** Protoplastos de polen de *A. tequilana*. (a) mononucleado, (b) binucleado. **G)** Tubo polínico (tp) de *A. tequilana* (in vitro) (flecha) entrando al óvulo a través del micrópilo. Micrografía en (G): F. J. Romo-Paz.

Las flores del género *Agave* son hermafroditas y protándricas, es decir los dos sexos (masculino y femenino) existen en la misma flor y el androceo (compuesto de seis estambres con anteras) madura antes que el gineceo (pistilos con ovario y óvulos) (Figuras 4B). Esta es una estrategia para facilitar la alogamia, que a su vez produce variabilidad genética.

Por otra parte, en general, este género consta de 60 cromosomas. McKain *et al.* (2012) se refieren al cariotipo ABK (Agavoideae Bimodal Karyotype), dentro del cual se encuentran 10 géneros con aproximadamente 358 especies, con un cariotipo $n=25S + 25L$. Esto implica que una célula somática ($2n$) contiene 50 cromosomas grandes y 10 cromosomas chicos (Figuras 5 y 6). McKain *et al.* (2012) concluyeron, mediante análisis filogenómico, que el cariotipo bimodal en los géneros *Yucca* y *Agave* pudo haber sido el resultado de un evento de alopoliploidía.

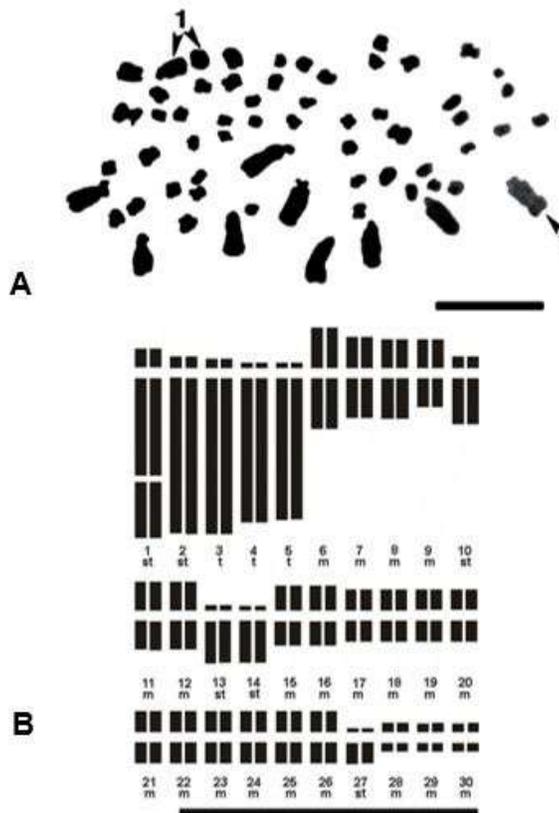


Figura 5. Plantas normales de *A. tequilana* var. Azul con cariotipo bimodal de $2n=2x=60$. **A)** Cromosomas en metafase mitótica. Barra = 10 μ m. **B)** Ideograma indicando un cariotipo de 42 metacéntricos+12 subtlocéntricos+6 cromosomas telocéntricos. El número 1 indica un par de cromosomas grandes telocéntricos con una constricción secundaria. Reproducción de Ruvalcaba-Ruiz et al. (2012). In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant (2012) 48:144-152 con Licencia No. 5525690456533 de Springer Nature.

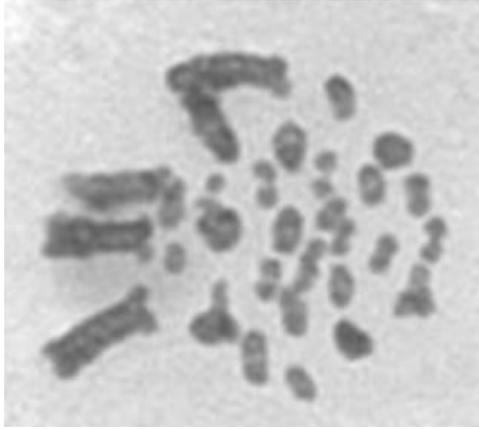


Figura 6. Fase Diploteno en la meiosis normal de *Agave tequilana*. Cariotipo (n) bimodal de 5 bivalentes grandes + 25 bivalentes chicos. Micrografía: J. M. Rodríguez-Domínguez.

Gametofito masculino

La flor de *Agave* tiene seis estambres de tamaño variable según la especie. En el caso de *A. tequilana*, los filamentos son de aproximadamente 5 cm y con antera díteca de 2.5 cm de longitud en la punta del filamento (Gentry, 1982) (Figura 4B). En el momento de madurez del polen, la dehiscencia de las seis anteras es longitudinal y simultánea (Figura 4C). Los granos son de morfología reticulada y disulcados (Figura 4D) (Alvarez & Köhler, 1987; Escobar-Guzmán *et al.*, 2008).

Microsporogénesis

El desarrollo del sexo masculino expresado en las anteras se inicia en células del tapetum de la antera (células madre del polen). En la célula madre del polen se inicia la microsporogénesis o meiosis, la cual consta de dos divisiones celulares sucesivas: una reduccional (meiosis I), que da como resultado un par de células haploides (díada) y otra ecuacional (meiosis II), que da como resultado cuatro células haploides; en el caso

del género *Agave* la tétrada es tetragonal (Figura 7). En la Figura 8 se muestran las etapas normales y consecutivas de la meiosis I y meiosis II de *A. geminiflora*, subgénero *Littaea*, grupo *Filiferae*.

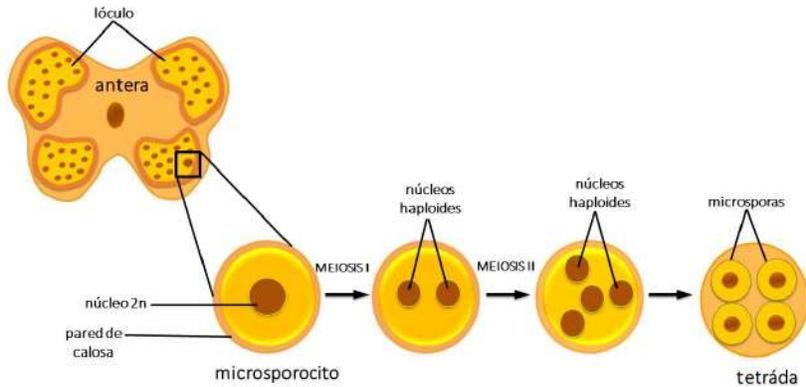


Figura 7. Inicio del desarrollo del polen. Microsporogénesis masculina a partir de la división meiótica de un microsporocito diploide hasta la formación de una tétrada de células haploides

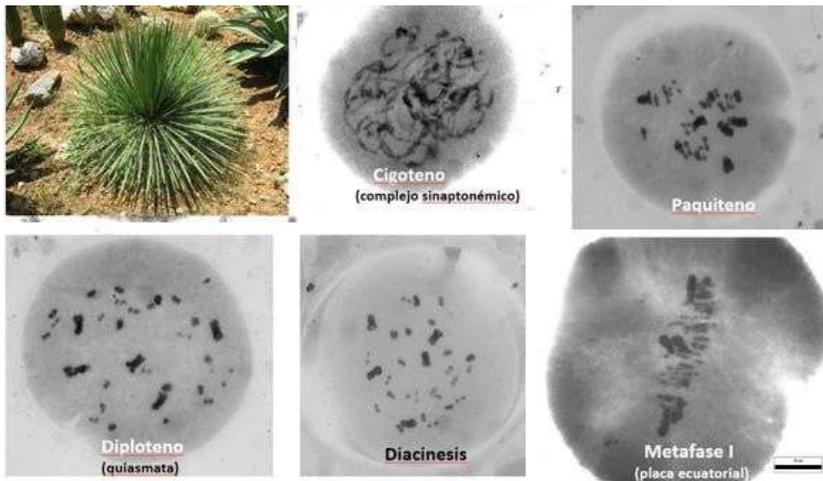


Figura 8-1. Meiosis masculina en *Agave geminiflora*, subgénero *Littaea*, grupo *Filiferae*. Barra = 10 μ m. Micrografías: J. M. Rodríguez-Domínguez.

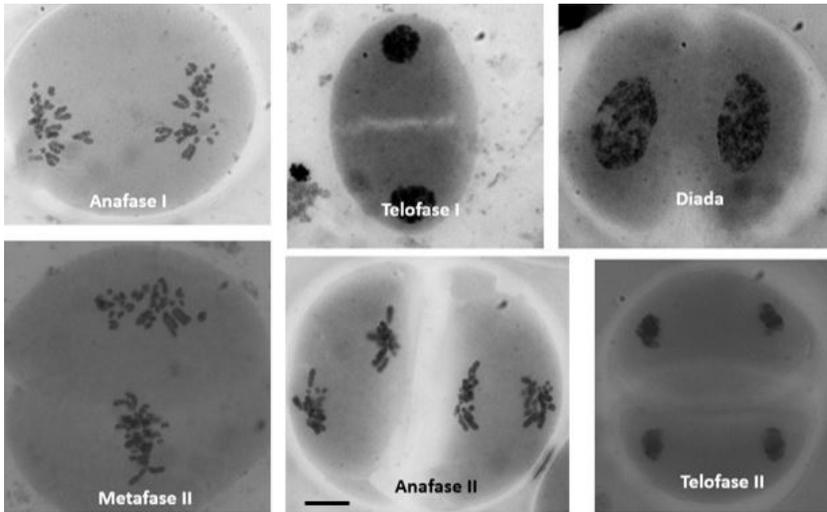


Figura 8-2. Meiosis masculina en *Agave geminiflora*, subgénero *Littaea*, grupo Filiferae. Barra = 10µm. Micrografías: J. M. Rodríguez-Domínguez.

En muchas especies de *Agave* suceden accidentes cromosómicos (puentes, cromosomas rezagados, ausencia de citocinesis en cualquiera de las dos divisiones meióticas) que dan como resultado granos de polen con diferente nivel de ploidía (n , $2n$) y micronúcleos que llegan a formar polen estéril, tal es el caso de especies como *A. stricta*, *A. tequilana* y *A. angustifolia* (Brandham, 1969; Ruvalcaba-Ruíz & Rodríguez-Garay, 2002; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2012; Rodríguez-Garay, 2017; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2018) (Figura 9).

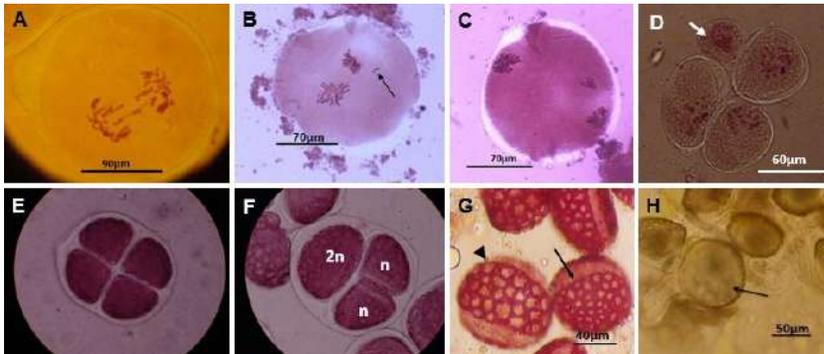


Figura 9. Anormalidades en la meiosis masculina en *A. tequilana*. **A)** Dos puentes, resultado de inversiones paracéntricas heterocigóticas. **B)** Anafase I anormal con número de cromosomas desigual en la díada resultante. Además, un cromosoma fuera del grupo de una célula de la díada (flecha). **C)** Telofase I anormal con varios cromosomas fuera del grupo de una célula de la díada (flecha). **D)** Tétrada de microsporas con contenido desigual de cromosomas. Micronúcleo (flecha). **E)** Tétrada tetragonal de *A. tequilana* resultado de una meiosis normal con dos divisiones sucesivas (reduccional y ecuacional). **F)** Triada anormal con dos granos haploides (n) y un grano diploide (2n) resultado de la ausencia de citocinesis en una de las díadas al final de la meiosis I. **G)** Grano de polen haploide normal (flecha) y grano gigante diploide (cabeza de flecha). **H)** Polen de *A. cupreata* en germinación *in vitro*. Flecha = polen diploide (2n).

Microgametogénesis

Durante la microgametogénesis cada una de las células haploides (microsporas), producto de la meiosis, dan lugar a dos células mediante una mitosis asimétrica: la célula vegetativa (que originará al tubo polínico) y la célula generativa, la cual vuelve a dividirse mitóticamente para dar lugar a las dos células espermáticas dentro del grano de polen maduro. Cuando este germina, las células espermáticas serán llevadas a través del tubo polínico hasta el saco embrionario (gametofito femenino) para llevar a cabo la doble fecundación. En algunas especies, la división de la célula generativa sucede durante la maduración del polen dando lugar a polen tricelular (Rotman *et al.*, 2005) (Figura 4E-F). En el caso del género *Agave*, se produce polen bicelular maduro y la célula generativa se divide en el tubo polínico

formado por la célula vegetativa (Escobar-Guzmán *et al.*, 2008; Piven *et al.*, 2001; Rotman *et al.*, 2005) (Figura 4E-G).

Gametofito femenino

Durante la generación gametofítica se producen los gametos femeninos (haploides) conocidos como sacos embrionarios, los cuales se desarrollan dentro del óvulo en el ovario de la flor. En la familia Asparagaceae el ovario es ínfero, trilocular y cada lóculo contiene dos hileras con numerosos óvulos (Figura 10A-B). Los óvulos son de tipo anátropo con placentación axilar (Figura 10B-D) (Piven *et al.*, 2001; García-Mendoza, 2007; González-Gutiérrez *et al.*, 2014).

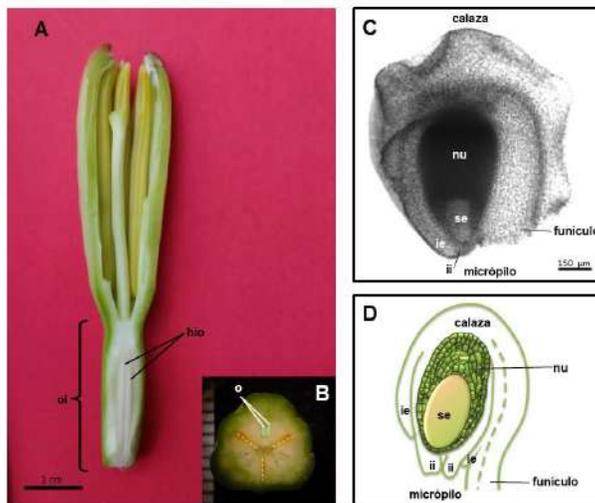


Figura 10. Flor de *Agave* spp. **A)** Corte longitudinal de la flor que muestra dos hileras de óvulos (hio) distribuidas a lo largo del ovario ínfero (oi). **B)** Corte transversal del ovario, se aprecian tres lóculos (línea punteada) con dos hileras de óvulos (o) cada uno, los óvulos poseen placentación axilar. **C)** Micrografía de un óvulo de *Agave tequilana* (tomada de González-Gutiérrez *et al.*, 2014). **D)** Diagrama de las partes que componen un óvulo de tipo anátropo (nu) nucela, (se) saco embrionario, (ii) integumento interno, (ie) integumento externo. Las líneas de separación de la regla en B equivalen a 1 mm.

Cada óvulo consta de un “cordón”- el funículo- que lo mantiene unido a la placenta; así como dos capas celulares llamadas tegumentos que lo rodean parcialmente, dejando un espacio libre denominado micrópilo, sitio por donde penetra el tubo polínico. El sitio opuesto al micrópilo es llamado calaza. Finalmente, en su interior se encuentra la nucela o megasporangio, que es el tejido donde se desarrollará el saco embrionario (Figura 10C-D) (Simpson, 2019).

El saco embrionario es el resultado de los procesos de megasporogénesis y megagametogénesis. La megasporogénesis comprende la formación de los productos de la meiosis a partir de una sola célula de la nucela llamada arquesporio. Posteriormente, en la megagametogénesis se lleva a cabo la división mitótica de uno o más productos de la meiosis y su posterior celularización y especialización (Yang, 2010).

Meiosis (Megasporogénesis)

La formación del saco embrionario inicia con la diferenciación de una de las células que componen la nucela del óvulo -el arquesporio- que a su vez forma la célula madre de la megaspora (CMM) o megasporocito. Durante la megasporogénesis la CMM genera cuatro núcleos haploides (tétrada) llamados megasporas.

Existen tres patrones distintos de megasporogénesis en Angiospermas: monospórico, bispórico y tetraspórico (Maheswari, 1950). Estos se diferencian por el número de productos meióticos que contribuyen directamente a la formación del saco embrionario durante el subsecuente proceso de megagametogénesis.

En el patrón monospórico, ambas fases de la meiosis son seguidas por citocinesis, dando lugar a cuatro células haploides. Durante el desarrollo bispórico, la meiosis I es acompañada por citocinesis y la formación de pared celular; sin embargo, la meiosis II ocurre sin la generación de platos celulares dando origen a dos células megasporas binucleadas. Finalmente, en el modelo tetraspórico ninguna fase de la meiosis incluye citocinesis, resultando en una sola célula con cuatro núcleos haploides (Figura 11).

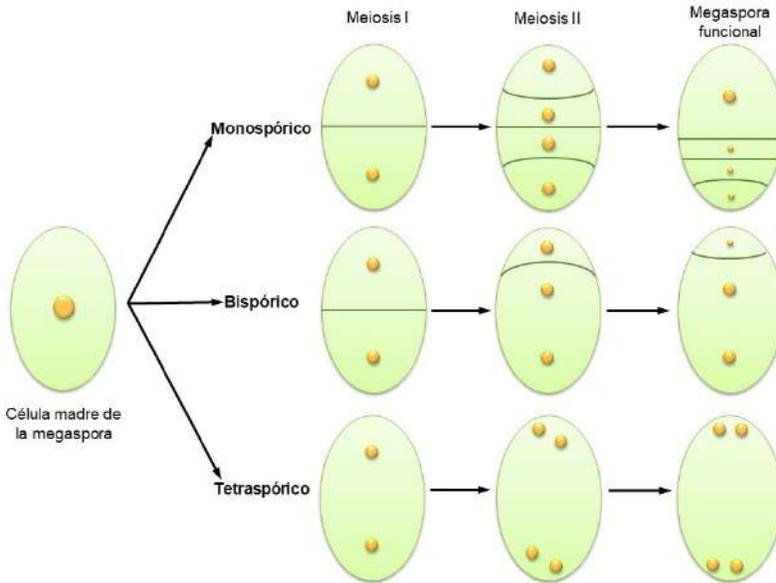


Figura 11. Esquema de los principales tipos de megasporogénesis. La célula madre de la megaspora ($2n$) se divide mediante meiosis para producir cuatro megasporas haploides. En el patrón monosporico se forma la pared celular después de cada fase de la meiosis, produciendo cuatro células mononucleadas. En el patrón bispórico la meiosis I es seguida de la formación de pared celular, pero no así en la meiosis II, formando dos células binucleadas. En el patrón tetrasporico ninguna fase de la meiosis es seguida de la formación de platos celulares, resultando en una célula con cuatro núcleos. Una sola célula (con uno, dos o cuatro núcleos), resultado de la meiosis, participa directamente en la formación del saco embrionario.

Una vez completada la meiosis, sólo una de las células generadas se mantiene viable, mientras que el resto sufre muerte celular. Esta célula que puede contener uno, dos o cuatro núcleos es denominada megaspora funcional (Figura 11). Durante la megagametogénesis la megaspora funcional será la responsable de formar el saco embrionario.

En el caso de la familia Asparagaceae, a excepción de lo reportado en *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* (Piven *et al.*, 2001), que fueron descritos como bispóricos, la mayoría de los sacos embrionarios de las Asparagáceas estudiados hasta la fecha, incluyendo *A. tequilana* (González-Gutiérrez *et al.*, 2014), *Polianthes tuberosa* (González-Gutié-

rrez & Rodríguez-Garay, 2016), *Manfreda elongata* (Barranco-Guzmán *et al.*, 2019), *A. colimana* (Barranco-Guzmán & Rodríguez-Garay, 2020) y *A. inaequidens* (González-Gutiérrez *et al.*, 2021) tienen un origen monospórico (Figura 12).

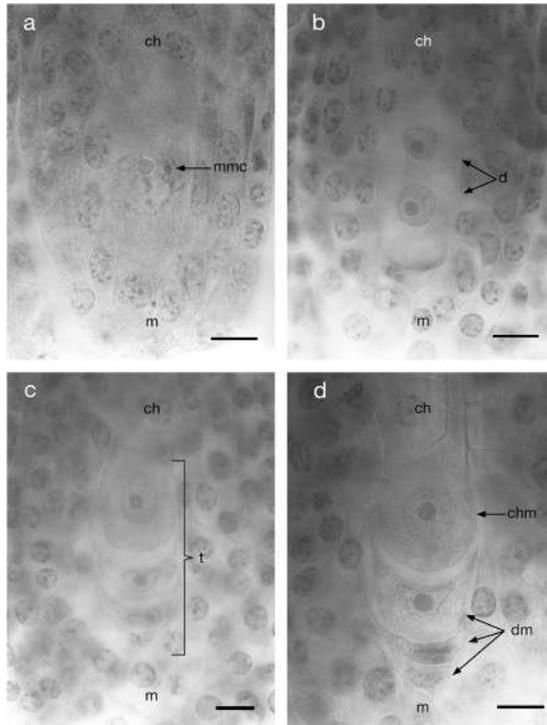


Figura 12. Megasporogenesis en *Agave tequilana*. A) Célula madre de la megaspóra (mmc) B) Meiosis I de la mmc resulta en una diada (d) de células haploides. C) Después de la meiosis II se produce una tétrada (t) lineal de células haploides. D) Finalmente, las tres megasporas más cercanas al micrópilo sufren muerte celular, mientras la del extremo calazal se mantiene viable, convirtiéndose en la megaspóra funcional (ch) calaza, (m) micrópilo, (chm) megaspóra calazal, (dm) megasporas en proceso de degradación. En todos los casos, barra de escala=10 μ m. Imagen tomada de: González-Gutiérrez *et al.* (2014).

Megagametogénesis

La megagametogénesis es el proceso por el cual se forma el gameto-fito femenino maduro o saco embrionario a partir de la megaspóra funcional. En un principio, la megaspóra funcional experimenta una o varias divisiones mitóticas sin citocinesis para formar un cenocito multinucleado. Posteriormente, mediante procesos de migración, fusión, celularización y especialización se forma el saco embrionario maduro (Figura 13).

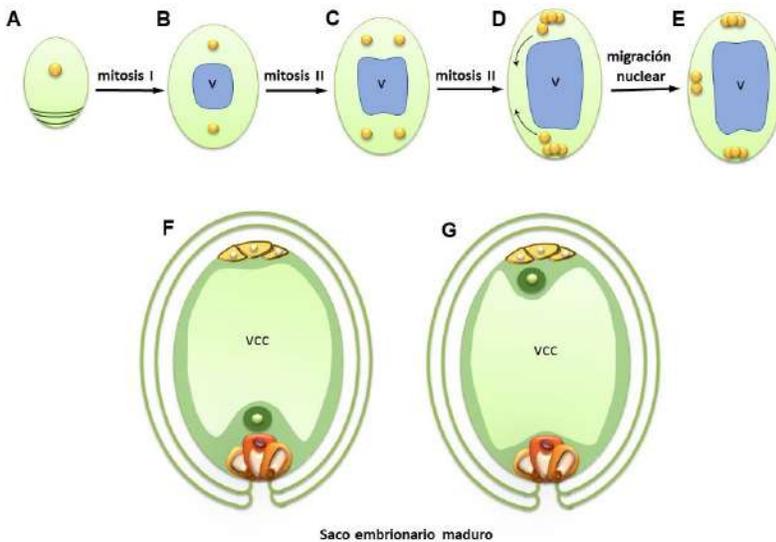


Figura 13. Diagrama del proceso de formación del saco embrionario tipo Polygonum. **A)** La megaspóra funcional se divide mediante mitosis sin citocinesis para formar un **B)** saco con dos núcleos que son separados por una vacuola central (v). Una segunda mitosis forma un saco con cuatro núcleos. Finalmente, una tercera ronda da lugar a **D)** un saco con cuatro núcleos en el polo calazal y cuatro en el micropilar. **E)** Un núcleo de cada polo (núcleos polares) migra para fusionarse con el otro para dar lugar al núcleo de la célula central. Durante la celularización y especialización las tres células del extremo calazal se convierten en las antípodas (amarillo). En el micrópilo se encuentran la célula huevo (rojo) y dos células sinérgidas (naranja); en la parte media se posiciona la célula central (verde) que puede tener, dependiendo la especie, el núcleo polarizado hacia el extremo micropilar **F)** o hacia el polo calazal **G)**.

Actualmente se reconocen 15 patrones de desarrollo del gametofito femenino en angiospermas. Su clasificación se basa en el tipo de megasporogénesis que le precede, así como en el número de divisiones mitóticas efectuadas para llegar a la madurez del saco embrionario (Yadegari & Drews, 2004). El patrón de desarrollo más común es el tipo Polygonum, el cual presentan aproximadamente el 70% de las plantas con flor, incluyendo familias de importancia económica y alimentaria como Brassicaceae, Gramineae, Malvaceae, Leguminoseae y Solanaceae (Huang & Russell, 1992).

La megagametogénesis dentro del género *Agave* y otros miembros de la familia Asparagaceae sigue de forma general las pautas del modelo Polygonum con algunas particularidades en las fases de migración nuclear y polaridad celular que hacen del saco embrionario del *Agave* un modelo de estudio de interés en áreas de biología del desarrollo y la reproducción sexual (González-Gutiérrez, 2022) (Figura 14).

La megagametogénesis tipo Polygonum inicia con un incremento en tamaño de la MF (Figura 13A) seguido de tres rondas de mitosis sin citocinesis para formar un cenocito de ocho núcleos. La primera división mitótica de la MF genera dos núcleos, uno de ellos migra al extremo calazal del saco en desarrollo mientras que el otro se desplaza al polo micropilar (Figura 13B). Simultáneamente, inicia la formación de una gran vacuola central que divide ambos núcleos hijos (Figura 13B). Una segunda (Figura 13C) y tercera división mitótica dan lugar a una gran célula con cuatro núcleos en cada extremo del saco (Figura 13D). Posteriormente, un núcleo de cada extremo -llamados núcleos polares por su posición inicial- migran hasta encontrarse y fusionarse (Figura 13E). Finalmente, se forman las paredes celulares alrededor de cada núcleo del saco y, enseguida, las siete nuevas células adquieren su identidad (Reiser & Fisher, 1993) (Figura 13F-G). Estas células se agrupan en cuatro tipos celulares, tres células antípodas en el polo calazal, dos sinérgidas y una célula huevo en el extremo micropilar, y la llamada célula central ($2n$), que es el resultado de la fusión de los núcleos polares (Figura 13F-G) (Yang *et al.*, 2010).

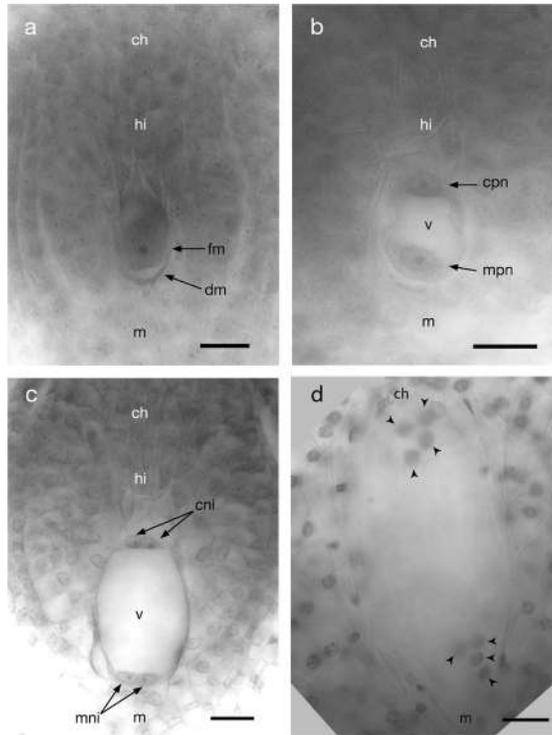


Figura 14. Megagametogénesis en *Agave tequilana*. **A)** Megaspora funcional (fm) y restos de las megasporas degradadas (dm). **B)** Saco embrionario con dos núcleos hijos productos de la primera división mitótica de la FM, un núcleo calazal (cpn) y uno micropilar (mpn) separados por una vacuola central (v). **C)** Gametofito con cuatro núcleos, dos en el extremo calazal (cni) y dos en el micropilar (mni) después de una segunda ronda de mitosis. **D)** Una tercera mitosis sin citocinesis da lugar a un saco embrionario con ocho núcleos (cabezas de flecha), cuatro en cada extremo. ch, calaza; hi, hipostasa; m, micrópilo. En todos los casos, barra de escala=20 μ m. Imagen tomada de González-Gutiérrez et al. (2014).

De las células que conforman el saco embrionario, las células huevo y central actúan directamente como gametos y serán, respectivamente, las responsables en el proceso de doble fertilización para formar el embrión y el endospermo de la semilla en desarrollo (Figura 16). A diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de las especies vegetales, incluyendo los modelos *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* (Huang & Sheridan, 1994; Sprunck & Groß-Hardt, 2011), o la especie comercial

Stevia rebandiana (González-Gutiérrez, sin publicar), donde el núcleo de la célula central se posiciona en su extremo más micropilar (cercano a la célula huevo) (Figura 15A). El núcleo de la célula central de los *Agaves* presenta una notoria polaridad hacia el extremo opuesto (Tilton, 1980; González-Gutiérrez *et al.*, 2014) (Figura 15B). Esto es importante dado que la posición de los núcleos y células a lo largo del eje calazal-micropilar del saco es lo que determina posteriormente su identidad celular (Kägi & Groß-Hardt, 2007). La posición de estos núcleos y sus respectivas células dentro del saco embrionario es determinada por una serie compleja de mecanismos que van desde la influencia de hormonas vegetales (Sundaresan & Alandete-Saez, 2010) hasta la organización de su citoesqueleto, especialmente de la formación de filamentos de F-actina (Kawashima & Berger, 2015). Aunado a la polaridad del núcleo de la célula central del *Agave*, sus sacos embrionarios poseen tamaños relativamente grandes, por lo que para llevar a cabo el segundo evento de fertilización el núcleo espermático debe viajar (dependiendo de la especie) hasta 210 μm (González-Gutiérrez *et al.*, 2014).

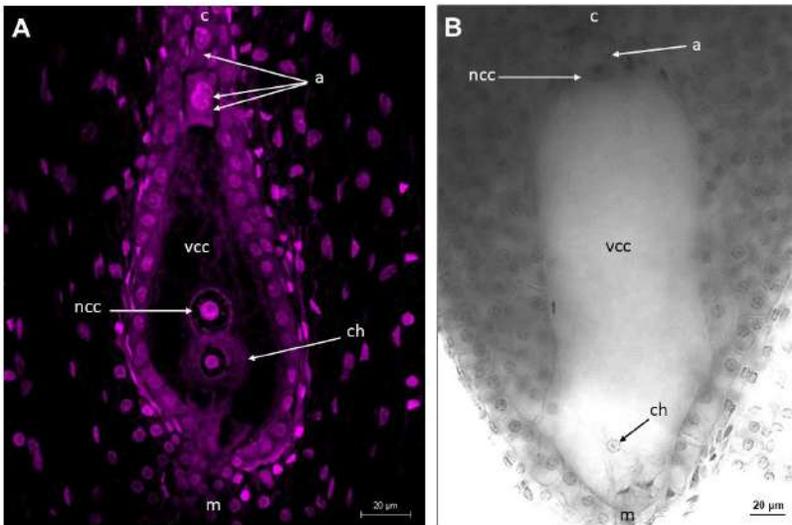


Figura 15. Sacos embrionarios maduros tipo Polygonum. **A)** En el saco maduro de *Stevia rebaudiana* el núcleo de la célula central (ncc) se encuentra polarizado hacia el polo micropilar (m) muy cercano a la periferia de la célula huevo (ch), mientras que su vacuola (vcc) queda restringida al espacio medio y calazal del saco embrionario. **B)** *Agave tequilana* muestra una polaridad invertida en el núcleo de la célula central, por lo que se posiciona justo debajo de las células antípodas en el polo calazal (c) del saco embrionario (tomada de González-Gutiérrez *et al.*, 2014). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-575>

Fertilización y Embriogénesis

La doble fertilización

La fertilización en las angiospermas es un proceso extraordinario que no tiene parangón en hongos, animales y otros eucariotes que producen gametos, ya que involucra dos procesos independientes, pero coordinados, de fertilización mediada por F-actina, también conocida como *doble fertilización* (Figura 16A) (Kawashima *et al.*, 2014; Ohnishi & Okamoto, 2015; Fatema *et al.*, 2019).

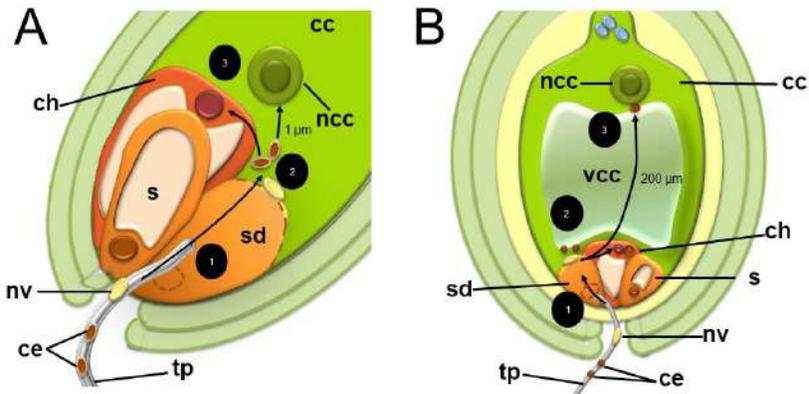


Figura 16. La doble fertilización. **A)** El mecanismo de la doble fertilización en *Arabidopsis thaliana* es considerado general dado que se ha observado en otras especies de plantas modelo, este inicia con (1) la irrupción y estallamiento del tubo polínico en el polo micropilar del saco embrionario. Allí se liberan las células espermiáticas que (2) se fusionarán (plasmogamia) con la célula huevo y la célula central. Una vez dentro, (3) los núcleos espermiáticos se fusionarán (cariogamia) con el núcleo de la célula huevo y la célula central dando lugar al cigoto y al endospermo, respectivamente. **B)** En Asparagáceas, el mecanismo de la doble fertilización es similar al de *A. thaliana* (1), salvo que el segundo núcleo espermiático tiene que recorrer una distancia significativamente más larga para alcanzar el núcleo de la célula central (2). Para salvar ese obstáculo, las Asparagáceas desarrollaron estructuras especiales de F-actina. (tp) tubo polínico, (ce) célula espermiática, (nv) núcleo vegetativo, (s) sinérgida, (sd) sinérgida degenerada, (ch) célula huevo, (ncc) núcleo de la célula central, (cc) célula central, (vcc) vacuola de la célula central.

La doble fertilización ha sido descrita con detalle molecular en *Arabidopsis thaliana* y debido a que también se le ha observado con variaciones, en arroz, maíz y tabaco, se le considera un proceso de fertilización general (Ali *et al.*, 2020). Cuando el polen germina y emerge el tubo polínico, este penetra por el pistilo hasta alcanzar el micropilo guiado por péptidos de atracción secretados por las células sinérgidas (Figura 16A) (Zhou & Dresselhaus, 2018; Susaki *et al.*, 2023). Una vez en el micropilo, el tubo polínico irrumpe en el saco embrionario y estalla liberando dos células espermiáticas, mientras que la célula sinérgida receptora se degenera (Figura 16A, paso 1).

Secuencialmente, las células espermáticas se fusionan, una con la célula huevo y la otra con la célula central (Figura 16A, paso 2). En ambos casos, primero sucede la fusión de las membranas plasmáticas (plasmogamia), seguida de la migración de los núcleos espermáticos a las cercanías de los núcleos de la célula huevo y la célula central. Una vez próximos, ambos núcleos se fusionan (cariogamia) dando lugar al cigoto y la célula madre del endospermo, respectivamente (Figura 16A, paso 3) (Kawashima *et al.*, 2014).

El camino de los núcleos

Contrario a lo que pudiera creerse, los procesos posteriores a la plasmogamia de las células espermáticas con las células huevo y central, pero anteriores a la cariogamia de sus respectivos núcleos, son muy dinámicos y están altamente regulados (Zhou & Dresselhaus, 2018). El movimiento del núcleo espermático desde el sitio de la plasmogamia hasta el núcleo de las células huevo y central es dependiente del citoesqueleto de F-actina y su proteína motora asociada, miosina (Kawashima *et al.*, 2014; Kawashima & Berger, 2015; Fatema *et al.*, 2019). El viaje del núcleo espermático dentro de la célula central para alcanzar su núcleo es particularmente interesante ya que implica la formación de estructuras especializadas de F-actina alrededor del núcleo espermático (coronas y estrellas de actina), así como el movimiento espasmódico del citoesqueleto de F-actina que facilita el desplazamiento del núcleo espermático (Kawashima *et al.*, 2014).

La excepcionalidad de la doble fertilización en Asparagáceas

Las dimensiones atípicamente grandes del saco embrionario de las Asparagáceas, así como la observación de grandes filamentos de F-actina dentro de la célula central en el momento de la segunda fertilización en especies de los géneros *Agave*, *Manfreda*, *Yucca* y *Prochnyanthes* (González-Gutiérrez *et al.*, 2020, 2021), sugirieron la hipótesis de un mecanismo alternativo de doble fertilización para este tipo de plantas. Aunque la primera fertilización tanto en *A. thaliana* como en *Agave*

son muy similares (Figura 16A-B), se observan grandes diferencias durante la segunda, posiblemente relacionadas con la necesidad de salvar la gran distancia que media entre el sitio de la plasmogamia de la célula central con la segunda célula espermática (Figura 16B) y el núcleo de la célula central, en el extremo calazal, donde ocurre la segunda cariogamia. En la familia Asparagaceae esta distancia es aproximadamente 200 veces más grande que la observada en *A. thaliana* (González-Gutiérrez *et al.*, 2021). En *Agave inaequidens*, por mencionar uno de los casos estudiados con mayor profundidad, horas después de la polinización, pero cuando la fertilización aún no ocurre, el núcleo de la célula central se recubre de una capa de actina desde donde se proyectan filamentos radiales de la misma proteína (Figura 17A-B). Posteriormente, estos filamentos crecen hasta aproximarse al extremo micropilar de la célula central (Figura 17C). En paralelo, un gran filamento de F-actina, también llamado megacable, se desarrolla desde el núcleo de la célula central, perfora la vacuola de la misma célula generando un túnel, captura el núcleo espermático, lo envuelve y parece llevarlo por un mecanismo aún desconocido a través del túnel intravacuolar hasta el núcleo de la célula central donde ocurre la cariogamia y la segunda fertilización (Figura 17D-F), la cual dará origen al endospermo (González-Gutiérrez *et al.*, 2021).

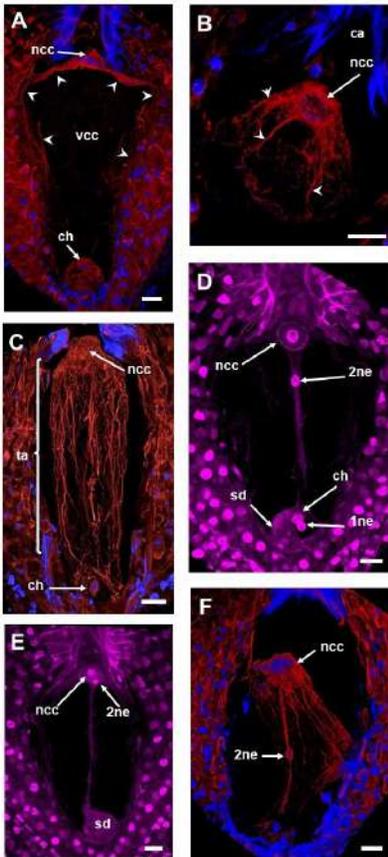


Figura 17. La excepcionalidad de la segunda fertilización en Asparagáceas. El saco embrionario de las Asparagáceas es excepcionalmente grande, lo que ha generado estructuras de F-actina que facilitan el viaje del segundo núcleo espermático desde el sitio de la plasmogamia hasta el núcleo de la célula central. **A)** Después de la polinización, pero antes de la fertilización, el núcleo de la célula central se recubre de F-actina. Posteriormente, **B)** filamentos de F-actina se proyectan desde el núcleo de la célula central y crecen **(C)** hasta llegar al polo micropolar. En paralelo, el megacable se desarrolla desde el núcleo de la célula central, perfora la vacuola de la misma célula generando un túnel **(D, E)**, captura el núcleo espermático, lo envuelve **(F)**, y lo lleva a través del túnel intravacuolar hasta el núcleo de la célula central **(D, E y F)**. A, B, C y F, micrografías confocales de óvulos teñidos con rodamina-faloidina (rojo) y Hoechst 33258 (azul); D y F, micrografías confocales de óvulos teñidos con el reactivo de Feulgen. (ncc) núcleo de la célula central, (vcc) vacuola de la célula central, (ch) célula huevo,

(ca) calaza, (ta) túnel de actina, (sd) sinérgida degenerada, (1ne) primer núcleo espermático, (2ne) segundo núcleo espermático. En todos los casos, barra= 20 μm . Imágenes tomadas de González-Gutiérrez *et al.* (2021).

La formación del endospermo

El endospermo es un tejido de reserva que alimenta y protege al embrión durante su desarrollo. Como se mencionó anteriormente, el desarrollo del endospermo inicia una vez que la célula central es fertilizada y presenta cuatro fases: cenocito, celularización, diferenciación y muerte celular (Ali *et al.*, 2023). Durante la fase cenocítica,

el núcleo de la célula central fertilizada se divide de manera continua sin formar células nuevas (de allí el nombre de cenocito). El endospermo en este nivel de desarrollo se divide en tres zonas: endospermo micropilar, endospermo calazal y endospermo periférico. La fase de celularización en *A. thaliana* inicia desde el endospermo micropilar hacia el periférico y deja descelularizado al endospermo calazal. Los núcleos próximos a la calaza formarán posteriormente el quiste cenocítico (Ali *et al.*, 2023). En *Agave* el programa del desarrollo del endospermo es ligeramente diferente ya que su fase de celularización comienza por la cámara calazal, se extiende por el endospermo periférico y concluye en la cámara micropilar (González-Gutiérrez *et al.*, 2021) (Figuras 18 y 19).

El papel del citoesqueleto de F-actina y microtubular durante la fase cenocítica del desarrollo del endospermo fue descrito recientemente por Ali *et al.* (2023). A diferencia de lo observado durante la segunda fertilización que es completamente soportada por F-actina, el movimiento de los núcleos del cenocito es promovido por microtúbulos, mientras que la restricción del movimiento y la distribución de los mismos es organizada por estrellas de F-actina que rodean a los núcleos (Ali *et al.*, 2023). La migración de los núcleos producto de las primeras divisiones de la célula madre del endospermo también se ha observado que están acompañadas de fluctuaciones de Ca^{2+} (Barranco-Guzmán *et al.*, 2019).

Después de la fase de celularización, que implica la formación de paredes celulares, el endospermo puede ser absorbido por el embrión, como en *A. thaliana*, pero en otras especies como las del género *Agave* permanece como una reserva de carbohidratos y lípidos que son utilizados para la germinación de la semilla (Verma *et al.*, 2022).

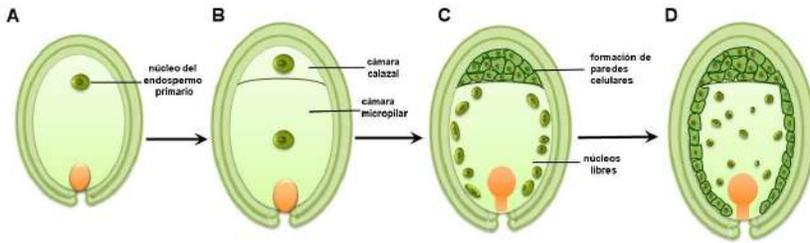


Figura 18. Esquema del desarrollo general del endospermo en *Agave*. El desarrollo del endospermo en *Agave* es diferente al de *A. thaliana*. **A)** Como producto de la segunda fertilización se genera el núcleo del endospermo primario que se divide múltiples veces formando un cenocito (célula con núcleos múltiples, **B** y **C**) que recubre las paredes de la célula central. Posteriormente, (**C**) viene el proceso de celularización en el que los núcleos del cenocito se desplazan y ordenan utilizando el citoesqueleto microtubular y de F-actina y se sintetizan paredes celulares. Este proceso sucede de manera ordenada desde la cámara calazal hasta la micropolar, pasando por la región periférica. En paralelo, (**D**) el embrión se desarrolla a partir del cigoto generado en la primera fertilización.

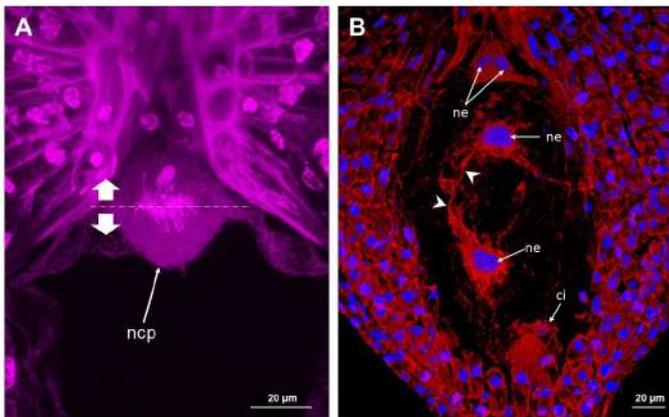


Figura 19. Desarrollo primario del endospermo en *Agave inaequidens*. **A)** Primera división del núcleo de la célula madre del endospermo (ncp) teñida con Feulgen. **B)** Durante la fase cenocítica los núcleos del endospermo se dividen repetidamente (ne, teñidos con Hoechst 33258, azul), se desplazan y, utilizando como soporte estructuras de F-actina (teñidas con rodamina-faloidina, rojo), forman una capa que recubre las paredes del saco embrionario. Imágenes tomadas de González-Gutiérrez et al. (2021). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.774098>

Conclusiones

La reproducción sexual de las Angiospermas es un proceso fundamental para conservar la diversidad genética que, en gran medida, asegura su supervivencia. En el caso del género *Agave*, este proceso es de vital importancia e interés antropocéntrico. Lo mismo aplica para otros géneros de la familia, como *Yucca* y *Polianthes*, que han sido aprovechados por el hombre desde tiempos remotos. Es importante hacer énfasis en el género *Agave*, el cual es fuente de riqueza en forma de textiles, alimentos, bebidas, medicamentos y un soporte natural contra la erosión de los suelos. Los anteriores motivos hacen que el conocimiento científico profundo de la sexualidad de estas plantas sea de primordial importancia para su conservación y aprovechamiento sustentable.

Referencias

- Ali, M. F., Shin, J.M., Fatema, U., Kurihara, D., Berger, F., Yuan, L. & Kawashima, T. (2023). Cellular dynamics of coenocytic endosperm development in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Plants*, 9, 330-342. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01331-7>
- Ali, M. F., Fatema, U., Peng, X., Hacker, S. W., Maruyama, D., Sun, M. X. & Kawashima, T. (2020). ARP2/3-independent WAVE/SCAR pathway and class XI myosin control sperm nuclear migration in flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (51), 32757-32763. <https://doi.org/10.1073/pnas.2015550117>
- Alvarez, A. & Köhler, E. (1987). Morfología del polen de las Agavaceae y algunos géneros afines. *Grana*, 26 (1), 25-46. <https://doi.org/10.1080/00173138709428902>
- Barba-González, R. (2001). *Efecto de la cafeína en los procesos de división celular de meristemas radiculares de cebolla (Allium cepa L.)* [tesis de maestría, CUCEI-Universidad de Guadalajara]. Repositorio Institucional UdeG. <http://hdl.handle.net/20.500.12104/47928>
- Barranco-Guzmán, A. M., González-Gutiérrez, A. G. y Rodríguez-Garay, B. (2019). The embryo sac development of *Manfreda elongata*

- (Asparagaceae). *Flora*, 260, 151480. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151480>
- Barranco-Guzmán, A. M., González-Gutiérrez, A.G., Rout, N. P., Verdín, J. & Rodríguez-Garay, B. (2019). Cytosolic calcium localization and dynamics during early endosperm development in the genus *Agave* (Asparagales, Asparagaceae). *Protoplasma*, 256 (4), 1079–1092. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01366-2>
- Barranco-Guzmán, A. M., & Rodríguez-Garay, B. (2020). Development of the female gametophyte of *Agave colimana*, subgenus *Littaea* (Asparagaceae). *The Journal fo the Torrey Botanical Society*, 147 (3), 281-288. <https://doi.org/10.3159/TORREY-D-18-00042.1>
- Barrow, J. R., Chaudhari, E., & Dunford, M. P. (1973). Twin Spots on Leaves of Homozygous Cotton Plants. *Journal of Heredity*, 64 (4), 222-226. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108393>
- Brandham, P. E. (1969). Inversion heterozygosity and sub-chromatid exchanges in *Agave stricta*. *Chromosoma*, 26 (3), 270-286. <https://doi.org/10.1007/BF00326522>
- Colnaghi, M., Lane, N., & Pomiankowski, A. (2022). Repeat sequences limit the effectiveness of lateral gene transfer and favored the evolution of meiotic sex in early eukaryotes. *PNAS*, 119 (35), e2205041119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2205041119>
- Escobar-Guzmán, R. E., Zamudio-Hernández, K. Gil-Vega, K. & J. Simpson, J. (2008). Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany*, 86 (11), 1343-1353. <https://doi.org/10.1139/B08-099>
- Fatema, U., Ali, M. F., Hu, Z., Clark, A. J., & Kawashima, T. (2019). Gamete nuclear migration in animals and plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 517. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00517>
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 15-23. <https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf>
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press.
- Gómez-Rodríguez, V. M., Barba-González, R. y Rodríguez-Garay, B. (2018). Spontaneous occurrence of micronuclei in developing microspores of *Agave angustifolia* Haw. cultivar “Lineño” and

- A. tequilana* Weber cultivar “Azul” (Asparagales, Asparagaceae). *Caryologia*, 71 (1), 58-62. <https://doi.org/10.1080/00087114.2017.1416450>
- Gómez-Rodríguez, V. M., Rodríguez-Garay, B., & Barba-González R. (2012). Meiotic restitution mechanisms involved in the formation of 2n pollen in *Agave tequilana* Weber and *Agave angustifolia* Haw. *SpringerPlus*, 1, 17. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-17>
- González-Gutiérrez, A. G. (2022). *El papel de la F-actina en la doble fertilización del Agave* [tesis de doctorado, CIATEJ]. Repositorio Institucional CIATEJ.
- González-Gutiérrez, A. G., Gutiérrez-Mora, A., Verdín, J., & Rodríguez-Garay, B. (2021). An F-actin mega-cable is associated with the migration of the sperm nucleus during the fertilization of the polarity-inverted central cell of *Agave inaequidens*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 774098. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.774098>
- González-Gutiérrez, A. G., Gutiérrez-Mora, A., & Rodríguez-Garay, B. (2014). Embryo sac formation and early embryo development in *Agave tequilana* (Asparagaceae). *SpringerPlus*, 3, 1-11. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-575>
- González-Gutiérrez, A. G., Verdín, J., & Rodríguez-Garay, B. (2020). Simple whole-mount staining protocol of F-actin for studies of the female gametophyte in Agavoideae and other crassinucellate ovules. *Frontiers in Plant Science*, 11, 384. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00384>
- González-Gutiérrez, A. G., & Rodríguez-Garay, B. (2016). Embryogenesis in *Polianthes tuberosa* L var. Simple: from megasporogenesis to early embryo development. *SpringerPlus* 5, 1804. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3528-z>
- Huang, B. Q. & Sheridan, W. F. (1994) Female gametophyte development in maize: microtubular organization and embryo sac polarity. *The Plant Cell*, 6 (6), 845-861. doi: 10.1105/tpc.6.6.845. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.6.845>
- Huang, B. Q. & Russell, S. D. (1992). Female germ unit: organization, isolation, and function. *International Review of Cytology*, 140, 233-292. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61099-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61099-2)

- Kägi, C., & Groß-Hardt, R. (2007). How females become complex: cell differentiation in the gametophyte. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (6), 633-638. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.07.011>
- Kawashima, T., Maruyama, D., Shagirov, M., Li, J., Hamamura, Y., Yelagandula, R., Toyama, Y., & Berger, F. (2014). Dynamic F-actin movement is essential for fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 3, e04501. <https://doi.org/10.7554/eLife.04501>
- Kawashima, T., & Berger, F. (2015). The central cell nuclear position at the micropylar end is maintained by the balance of F-actin dynamics, but dispensable for karyogamy in *Arabidopsis*. *Plant Reproduction*, 28 (2), 103-110. <https://doi.org/10.1007/s00497-015-0259-1>
- Lei, S. A. (2010). Benefits and costs of vegetative and sexual reproduction in perennial plants: A review of literature. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 42 (1), 9-14 <https://doi.org/10.2181/036.042.0103>
- Maheshwari, P. (1950). *An introduction to the embryology of angiosperms (1ra ed.)*. McGraw-Hill.
- McKain, M. R., Wickett, N., Zhang, Y., Ayyampalayam, S., McCombie, W.R., Chase, M. W., Pires, J. C., Depamphilis, C.W. y Leebens-Mack, J. (2012). Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). *American Journal of Botany*, 99 (2), 397-406. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100537>
- Ohnishi, Y., & Okamoto, T. (2015). Karyogamy in rice zygotes: actin filament-dependent migration of sperm nucleus, chromatin dynamics, and de novo gene expression. *Plant Signaling & Behavior*, 10 (2), e989021. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.989021>
- Piven, N. M., Barredo-Pool, F. A., Borges-Argáez, I. C., Herrera-Alamillo, M. A., Mayo-Mosqueda, A., Herrera-Herrera, J. L., & Robert, M. L. (2001). Reproductive biology of henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *American Journal of Botany*, 88 (11), 1966-1976. <https://doi.org/10.2307/3558424>

- Reiser, L. & Fischer, R. L. (1993). The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell*, 5, 1291. <https://doi.org/10.2307/3869782>
- Rotman, N., Durberry, A., Wardle, A., Yang, W. C., Chaboud, A., Faure, J. E., Berger, F., & Twell, D. (2005). A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants. *Current biology*, 15(3), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.013>
- Ruvalcaba-Ruiz, D., & Rodríguez-Garay, B. (2002). Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul. *BMC Plant Biology*, 2, (10) . <https://doi.org/10.1186/1471-2229-2-10>
- She, W., y Baroux, C. (2014). Chromatin dynamics during plant sexual reproduction. *Frontiers in Plant Science*, 5, 354. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00354>
- Simpson, M. G. (2019). Plant Morphology. En *Plant Systematics (Tercera Edición)* (pp. 469-535). Academic Press. ISBN 9780128126288, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812628-8.50009-2>.
- Sprunck, S., & Groß-Hardt, R. (2011). Nuclear behavior, cell polarity, and cell specification in the female gametophyte. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 123-136. <https://doi.org/10.1007/s00497-011-0161-4>
- Sundaresan, V., & Alandete-Saez, M. (2010). Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development*, 137 (2), 179-189. <https://doi.org/10.1242/dev.030346>
- Susaki, D., Izumi, R., Oi, T., Takeuchi, H., Shin, J. M., Sugi, N., Kinoshita, T., Higashiyama, T., Kawashima, T. & Maruyama, D. (2023). F-actin regulates the polarized secretion of pollen tube attractants in *Arabidopsis* synergid cells. *The Plant Cell*, 35 (4), 1222-1240. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac371>
- Tilton, V. R. & Mogensen, H. L. (1980). Ultrastructural aspects of the ovule of *Agave parryi* before fertilization. *Phytomorphology*, 29, 338-50. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IN19810663823>
- Verma, S., Attuluri, V. P. S. & Robert, H. S. (2022). Transcriptional control of *Arabidopsis* seed development. *Planta*, 255, 90. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03870-x>
- Wilkins, A. S., & Holliday, R. (2009). The Evolution of Meiosis From Mitosis. *Genetics*, 181 (1), 3-12. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.099762>

- Yadegari, R. & Drews, G. N. (2004). Female gametophyte development. *The Plant Cell*, *16*, S133-S141. <https://doi.org/10.1105/tpc.018192>
- Yang, W. C., Shi, D. Q. & Chen, Y. H. (2010). Female gametophyte development in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 89-108. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112203>
- Zhou, L., & Dresselhaus, T. (2019). Friend or foe: signaling mechanisms during double fertilization in flowering seed plants. *Current Topics in Developmental Biology*, *131*, 453-496. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.013>

1.2 MICROPROPAGACIÓN DE *Agave spp.* MEDIANTE PROLIFERACIÓN DE YEMAS AXILARES EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Marlene I. Ortiz-Mena¹, Antonia Gutiérrez-Mora², Karla L. Vega-Ramos¹, J. Manuel Rodríguez-Domínguez² y Ernesto Tapia-Campos²

RESUMEN

El cultivo del agave representa un aporte importante a la cultura y economía en México debido a sus múltiples aplicaciones: obtención de fibras, alimentos, medicamentos y producción de bebidas espirituosas. Las prácticas agrícolas en el cultivo presentan retos importantes en la actualidad, como baja productividad, plantaciones heterogéneas y baja disponibilidad de hijuelos. Una alternativa a los retos actuales de abastecimiento comercial del cultivo es la producción de plantas micropropagadas (cultivo *in vitro*); esta alternativa permite obtener plantas con características de calidad deseadas y condiciones asépticas; sin embargo, se propone utilizar los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's), los cuales ofrecen una mayor tasa de multiplicación que el método convencional de micropropagación y con mayor potencial de adaptabilidad a las condiciones *ex vitro*. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de los SIT's a diferentes frecuencias de inmersión en comparación con un sistema convencional en semisólido para la multiplicación *in vitro* de *Agave spp.*, a partir de yemas axilares. La comparación de ambos sistemas se realizó mediante la determinación de la tasa de multiplicación, parámetros de calidad y desarrollo, así como la respuesta a la adaptación *ex vitro* de las vitroplantas. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que todos los tratamientos

¹ Circunvalación Sur 51-A, Las Fuentes, Zapopan, México 45070.

*maortiz_al@ciatej.edu.mx

² Cam. Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, México

de SIT's duplicaron la tasa de multiplicación con relación al sistema en semisólido con diferencias estadísticamente significativas, además de obtener plantas con parámetros de calidad más altos en cuanto a altura, diámetro y hojas desarrolladas, así como una respuesta favorable a la adaptación *ex vitro*.

PALABRAS CLAVE: Agave, Micropropagación, Biorreactores, SIT's, Biotecnología.

Introducción

El agave representa uno de los cultivos de mayor interés en nuestro país al ser materia prima para la producción de las bebidas más emblemáticas de México. De acuerdo con el INEGI (2019), la Industria del Tequila y el Mezcal constituye la segunda actividad económica más importante dentro del conjunto de las bebidas alcohólicas, ya que representa 18.6% de la producción bruta total.

La forma más común de propagación de los agaves es a partir de hijuelos de rizoma; en condiciones normales existe alta disponibilidad de éstos; sin embargo, la industria de las bebidas espirituosas, continúa creciendo en conjunto con la demanda de materia prima; Adicional a esto, la forma convencional de propagación del agave ha conducido a la clonación de genotipos, lo cual facilita la susceptibilidad a enfermedades (Santacruz *et al.*, 2008), presentando un riesgo en la disponibilidad de material para la propagación de este cultivo.

De acuerdo con lo antes mencionado, la micropropagación contribuye a las estrategias de sustentabilidad y mejoramiento en la producción de aAgave. Su uso tiene como impacto en la producción comercial, contar con hijuelos sanos y libres de enfermedades para su establecimiento en campo, homogeneidad en plantaciones, propagar plantas con mayor potencial de desarrollo y conservar fidelidad genética de plantas sobresalientes seleccionadas. Si bien la micropropagación en semisólido es una herramienta favorable para abastecer demanda de planta con gran potencial de producción, también cuenta

con limitantes importantes, como elevado costo por intensa labor humana, tasas de multiplicación conservadoras y oportunidades de mejora en la calidad de las plantas a la adaptación *ex vitro*.

Para considerar la micropropagación como una estrategia de abastecimiento de *Agave*, es necesario incrementar su eficiencia y reducir costos de producción; estas limitantes pueden ser mitigadas por los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's): plataformas semi-automatizadas que permiten el contacto controlado de corto tiempo del material a propagar con un medio líquido (Georgiev *et al.*, 2014). Los SIT's poseen la ventaja de minimizar el tiempo dedicado a la manipulación del material y el requerimiento de personal; en algunas especies mejora la respuesta fisiológica de las plantas, incrementando índices de multiplicación y logrando mayor eficiencia en los cultivos (Escalona *et al.*, 1999), representando así, una alternativa que permite que la micropropagación resulte atractiva para el abastecimiento comercial de *agave*.

Materiales y métodos

Etapas 1: Evaluación de los Sistemas de cultivo en medio semisólido y SIT's

Se cultivaron 40 brotes de *Agave* spp. en medio semisólido y líquido MS (Murashige & Skoog, 1962), de acuerdo con la metodología descrita por Robert *et al.* En (2006). Para los SIT's se evaluaron cuatro frecuencias de Inmersión con un tiempo de inmersión de dos minutos en un sistema de frascos gemelos. Las condiciones de fotoperiodo fueron de 16 h luz, 8 h de oscuridad y temperatura de 25 ± 2 °C. Después de 30 días se evaluó la tasa de multiplicación viable (TMV), presencia de Hiperhidricidad en porcentaje (HH), plantas con porte para llevar a enraizamiento en porcentaje (PPE) y para los parámetros de calidad y desarrollo se midió la altura en cm (AP), diámetro de piña o tallo en cm (DP) y número de hojas (NH) de 15 brotes individualizados de cada réplica como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos y variables evaluadas en *Agave* spp. Sometidos a dos sistemas de propagación (sistema semisólido y SIT's)

Sistema de Micropropagación	Tratamiento	Réplicas	Frecuencia de inmersión	Parámetros Por Evaluar
SIT's	T1	5	1/4X	TMV
	T2	5	1/3X	DP
	T3	5	1/2X	AP
	T4	5	X	NH
Semisólido	T5	5	Testigo	HH
				PPE

En todos los tratamientos se utilizaron cinco replicas con con 40 brotes iniciales cada una, dando un total de 200 unidades experimentales por tratamiento.

TMV: tasa de multiplicación viable, DP: diámetro de piña-tallo en cm, AP: altura de planta en cm, NH: número de hojas, HH: Hiperhidricidad en porcentaje y PPE: plantas con porte para enviar a enraizamiento en porcentaje.

El tratamiento con mejores resultados de los SIT's, fue evaluado a mayor escala, por tiempos más prolongados (30, 60 y 90 días) en comparación con el Sistema en Semisólido. Se cultivaron 200 brotes por réplica, bajo las condiciones y evaluación de los parámetros anteriormente descritos. Las fórmulas empleadas para medir las plantas con porte para enviar a enraizamiento y tasa de multiplicación fueron:

$$\text{Plantas con porte para enviar a Enraizamiento en porcentaje} = \frac{\text{Brotes a enraizar obtenidos}}{\text{Brotes iniciales}} \times 100$$

$$\text{Tasa de multiplicación viable} = \frac{\text{Explantos sin hiperhidricidad obtenidos} - \text{Explantos iniciales}}{\text{Explantos iniciales}}$$

Etapas 2: Enraizamiento y adaptación ex vitro de las plantas obtenidas en semisólido y en SIT's

Se cultivaron 30 vitroplantas en medio semisólido y 30 vitroplantas en medio líquido MS, de acuerdo con la metodología descrita por Robert *et al.* En (2006) para el enraizamiento de vitroplantas bajo las condiciones anteriormente descritas. Transcurridos 30 días, las plantas se

adaptaron a condiciones ex vitro. A los 0, 30, 60 y 90 días se evaluó el porcentaje de mortalidad, los parámetros AP, DP, y NH de las plantas establecidas. A los 90 días se extrajeron cinco plantas de cada réplica de ambos tratamientos para tomar datos de peso fresco de raíces, piña y hojas de las vitroplantas; el tejido vegetal de las plantas se llevó a cámara de secado a 60°C durante 72 horas para posteriormente realizar mediciones de peso seco de raíces, piña y hojas.

Se empleó un diseño completamente al azar de un factor con cinco repeticiones tanto en la etapa 1 como en la 2. Los resultados obtenidos fueron analizados por comparación de medias con Análisis de Varianza ANOVA y prueba de Tukey al 95% de confianza en el software STATGRAPHICS Centurion XVI.

Resultados y discusión

Etapas 1: Evaluación de los sistemas de cultivo en medio semisólido y SIT's

Entre los tratamientos evaluados en SIT's, hubo diferencias significativas en el DP y AP de los brotes en donde el mejor tratamiento para los dos parámetros fue el T4. El PPE de plantas fue mayor para los tratamientos de SIT's, confirmando que, adicional al incremento de brotes, estos presentan mayor vigor. Lo anterior esto coincide con lo reportado por Rosales *et al.*, (en 2018), en donde no solo obtuvieron mayor número de brotes de *Stevia rebaudiana*, también lograron obtener plantas vigorosas con mayor número de hojas.

En los tratamientos en SIT's hubo presencia de Hiperhidricidad; sin embargo, la TM viable (eliminando brotes hiperhídricos) fue estadísticamente mayor en un 142%, en comparación con el tratamiento en semisólido. Se puede mejorar la calidad de los brotes obtenidos en SIT's ajustando el tiempo de inmersión, ya que la definición de éste contribuye a que los tejidos vegetales logren la máxima absorción de nutrientes, sin llegar a su hiperhidratación (Berthouly & Etienne, 2005). La mejor TM viable fue de 3.43X correspondiente al T4 en comparación con el T5-Ss (X), se muestra un resumen de resultados en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores promedio de variables de crecimiento y calidad en *Agave* spp. sometidos a diferentes condiciones de propagación (sistema semisólido y SIT's)

Tratamiento	DP (cm)	AP (cm)	NH	PPE	TMV
T1	0.39	3.35	3.51	75.00	2.09X
T2	0.41	3.72	3.26	74.00	1.79X
T3	0.41	3.35	3.05	54.50	2.40X
T4	0.46	4.20	3.07	67.00	3.43X
T5	0.35	2.46	3.29	47.00	1X
p value Tukey HSD	0.0000**	0.0000**	0.4301	0.0015*	0.0000**

Si el p value es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza.

*resultados significativos

**resultados altamente significativos

DP: diámetro de piña-tallo en cm, AP: altura de planta en cm, NH: número de hojas, PPE: plantas con porte para enviar a enraizamiento en porcentaje y TMV: tasa de multiplicación viable.

Los resultados obtenidos a los 30 días después del establecimiento demuestran que el uso de Sistemas de Inmersión temporal interviene en el incremento de la TM de explantes y adicional. Las vitroplantas obtenidas muestran un mayor desarrollo con parámetros de calidad más altos en cuanto a AP, DP y NH como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Aspecto de brotes obtenidos de los diferentes tratamientos en evaluación. T1-SIT's: frecuencia de Inmersión 1/4X, T2-SIT's: frecuencia de inmersión 1/3X, T3-SIT's: frecuencia de inmersión 1/2X, T4-SIT's: frecuencia de inmersión X y T5-Ss: tratamiento testigo en semisólido.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la TM viable a los 30, 60 y 90 días después del establecimiento (dde) entre el T4 y T5, resultando los datos favorecedores para el tratamiento 4, correspondiente a la micropropagación en Biorreactor. Respecto a las plantas con PPE, se encontraron diferencias estadísticamente significativas a los 30 y 60 días del ensayo; sin embargo, a los 90 días, si bien el T4 obtuvo un mayor porcentaje, estadísticamente no hubo diferencias. En cuanto a la HH, a los 30 y 60 días no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos; sin embargo, a los 90 días se obtuvo un porcentaje más alto de hiperhidricidad en el tratamiento 4, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio en variables de calidad en vitroplantas de *Agave* spp. sometidas a dos sistemas de propagación *in vitro* a los 90 dde

Tratamiento	90 días		
	HH	PPE	TM viable
T4 SIT's	5%	198%	5.49X
T5-Ss	2%	132%	3.6X
p value Tukey HSD	0.0105*	0.0721	0.0109*

Si el *p value* es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza.

*resultados significativos

**resultados altamente significativos

En la Figura 2 se puede apreciar que los brotes desarrollados en los SIT's obtuvieron un porte destacado en comparación con las vitroplantas obtenidas en el método convencional de propagación *in vitro*; en los parámetros de calidad evaluados se obtuvieron valores más altos en DP, AP y NH con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

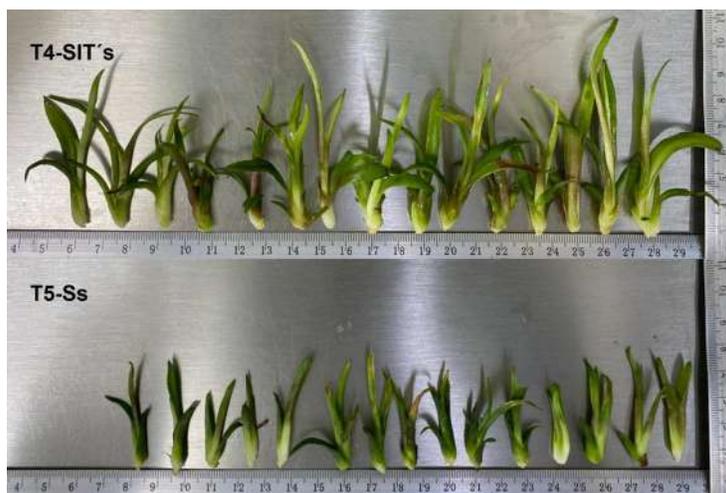


Figura 2. Aspecto de brotes obtenidos en T4 y T5 a los 90 días de evaluación

Tabla 4. Valores promedio en variables de calidad evaluados en *Agave* spp sometidos a dos sistemas de propagación in vitro a los 90dde

Tratamiento	DP (cm)	AP (cm)	NH
T4 SIT's	0.74	5.60	5.55
T5-Ss	0.63	4.07	4.56
p value Tukey HSD	0.0000**	0.0000**	0.0000**

Si el p value es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza.

*resultados significativos

**resultados altamente significativos

La renovación de la atmósfera dentro de los biorreactores evita la acumulación de gases perjudiciales como etileno, por lo que se mejora la oxigenación de tejidos (Ashraf *et al.*, 2013); además, el contacto intermitente con el medio de cultivo permite un mayor aprovechamiento de los nutrientes, CO² y agua (Aitken *et al.*, 1995), favoreciendo el desarrollo de los brotes de *Agave* en los Sistemas de Inmersión Temporal, como se observa en la Figura 3.

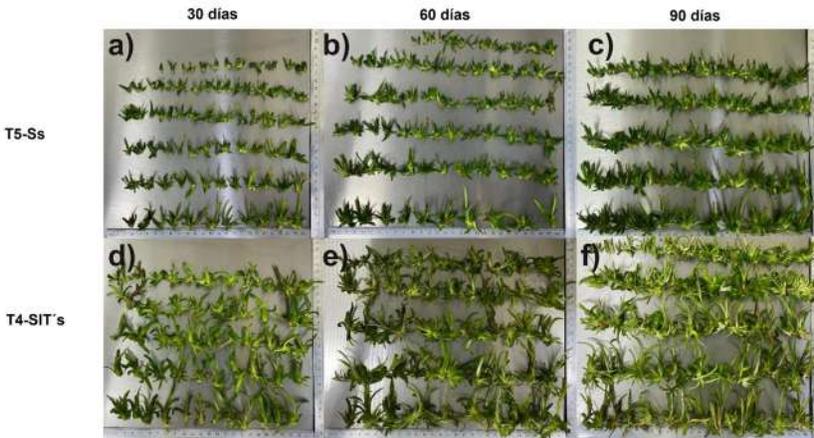


Figura 3. Aspecto de plantas obtenidas a los 30, 60 y 90 días en semisólido (a, b y c) y en SIT's (d, e y f)

Al extender los ciclos de multiplicación hasta 90 días, se siguió conservando el incremento en la producción de explantes en los SIT's con una TM viable de 5.49X, en comparación con 3.6X obtenido en el método convencional; si bien este factor de multiplicación fue mayor en los SIT's, el factor obtenido en semisólido también fue alto. Para el uso de los SIT's es importante considerar el volumen de medio de cultivo por explante. Existen autores que emplean 50 mL de medio de cultivo por explante (Salas *et al.*, 2011), mientras que hay otros que han triplicado esta densidad de población para mayor aprovechamiento del espacio en SIT's, obteniendo una reducción en el factor de multiplicación (Pérez *et al.*, 2020). Es importante considerar que, al incrementar el tiempo de los ciclos de multiplicación, debe considerarse también un incremento en el volumen de medio de cultivo para mantener un factor de multiplicación favorable. Para los parámetros de calidad evaluados se alcanzaron altura de 5.6 cm, 0.74 cm de diámetro de piña y 5.5 hojas desarrolladas en las plantas provenientes de los SIT's, mientras que las vitroplantas obtenidas del método semisólido obtuvieron una altura de 4.07 cm, diámetro de piña de 0.63 cm y 4.7 hojas desarrolladas.

Etapas 2: Enraizamiento y adaptación ex vitro de las plantas obtenidas en medio semisólido y en SIT's

Las vitroplantas obtenidas del proceso de propagación en SIT's presentaron mejores resultados con diferencias estadísticamente significativas para el parámetro DP en cm a los 0, 30 y 60 días de su adaptación *ex vitro*; sin embargo, para los 90 días este parámetro no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 5).

Los porcentajes de mortalidad a los 30 días de la adaptación en invernadero fueron de 2.65% y 3.29% para los tratamientos T4-SIT's y T5-Ss respectivamente. En el NH las plantas del T4 obtuvieron mejores resultados a los 30, 60 y 90 días de su adaptación *ex vitro* con diferencias significativas. Para la altura, si bien se obtuvieron promedios más altos para el T4, únicamente a los 60 días se obtuvo un resultado mayor con diferencias significativas.

Tabla 5. Parámetros de calidad a los 90 días de vitroplantas de *Agave* spp. sometidas a dos sistemas de micropropagación establecidas en invernadero

Tratamiento	DP (cm)	AP (cm)	NH
T4-SIT's	0.8523	8.7333	3.9459
T5-Ss	0.8521	8.4397	3.6379
p value Tukey HSD	0.9953	0.1424	0.0124*

Si el p value es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza.

*resultados significativos

**resultados altamente significativos

Para los parámetros de peso fresco y seco de tejido foliar y radicular, las plantas del T4 obtuvieron pesos más altos en un 36%, mientras que el peso seco de la piña de las plantas del T5-Ss obtuvieron un peso mayor con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Tabla 6. Valores promedio de peso fresco y seco de vitroplantas de *Agave* spp. sometidas a dos sistemas de micropropagación a los 90 días de su adaptación *ex vitro*

Tratamiento	Peso fresco (g)			Peso seco (g)		
	Raíces	Piña	Hojas	Raíces	Piña	Hojas
T4-SIT's	0.4501	0.6757	1.5102	0.0443	0.0425	0.1184
T5-Ss	0.2405	0.7371	1.3511	0.0345	0.0537	0.1013
p value Tukey HSD	0.0063**	0.2066	0.0677	0.0165*	0.0397*	0.0050**

Si el p value es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza.

*resultados significativos

**resultados altamente significativos

Los porcentajes de humedad en ambos tratamientos fueron mayores al 80% para los tejidos foliar, radicular y de piña. Esto se explica con la descripción de Sánchez *et al.* (2020), donde describe que son plantas suculentas y durante su etapa de adaptación *ex vitro* desarrollan su complejo estomático con células guarda y subsidiarias, las cuales le permiten mantener un adecuado nivel hídrico.

A los 30 y 60 días, las plantas obtenidas de los Sistemas de Inmersión Temporal presentaban un mejor aspecto y mayor robustez; sin embargo, a los 90 días se observó una coloración rojiza en las

plantas originadas de ambos tratamientos. Peng *et al.* (2008) y Cruz García *et al.* (2017) coinciden en que este efecto rojizo-púrpura en las hojas se debe a la acumulación de antocianinas, derivado a múltiples factores de estrés, principalmente asociado a la alta irradiación y a la deficiencia de nutrientes. Esto indica que la nutrición de las plantas ya no fue la adecuada para esta etapa de endurecimiento. La nutrición permaneció igual durante los 90 días en invernadero; sin embargo, existen reportes en donde se ha incrementado la aplicación de solución nutritiva a tres riego por semana cuando se disminuye la humedad relativa en invernadero (Cruz-García *et al.*, 2019).

Aún con esa aparente deficiencia nutricional, el T4-SIT's obtuvo pesos más altos para el tejido foliar y radicular, lo que indica que, efectivamente, las plantas originadas por Sistemas de Inmersión Temporal cuentan con mejores parámetros de calidad que las plantas obtenidas por el método convencional de micropropagación (Figura 4). Los porcentajes de humedad para el tejido radicular y de piña fueron más altos para las plantas provenientes de los SIT's; sin embargo, estos resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.



Figura 4. Aspecto de plantas obtenidas de T4 y T5 en invernadero a los 120 días de su adaptación *ex vitro*

Adicional al trabajo experimental, y con la finalidad de hacer un balance económico, se realizó un análisis de eficiencia considerando gastos en reactivos de producción en laboratorio con el método convencional de propagación; este análisis arrojó que el 21% del gasto en reactivos corresponde al costo por el agente gelificante. Con las tasas de multiplicación obtenidas en el Sistema de Inmersión Temporal y Sistema en Semisólido se realizó una proyección para determinar en cuánto tiempo se puede obtener la misma producción de plantas (330,000) con ambos sistemas de propagación. Esta proyección de producción arrojó una reducción de tiempo de cuatro meses con el uso de SIT's, impactando en un 25% de reducción de recursos en comparación con el método convencional de micropropagación. Estos resultados coinciden con lo reportado por Rocano *et al.*, en (2017), para la producción *in vitro* de *Juglans neotrópica* en SIT's, en donde se redujo el costo de producción de plantas en más de un 30%. Es necesario considerar que para la migración a Sistemas de Inmersión Temporal se requiere una inversión para adquirir los biorreactores automatizados necesarios para la producción de planta micropropagada.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en las diferentes etapas de evaluación demuestran que el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's) es una herramienta biotecnológica favorable para la multiplicación *in vitro* de *Agave* spp. no solo al incrementar su tasa de multiplicación viable, sino también al obtener plantas con parámetros de desarrollo más altos, así como con una buena adaptación a las condiciones *ex vitro*. La eficiencia obtenida con la tasa de multiplicación viable en SIT's permite acortar el tiempo requerido para obtener el mismo volumen de plantas que se obtiene con el método en semisólido, lo cual impacta en una reducción de recursos humanos y económicos.

Referencias

- Aitken-Christie, J., Kozai, T., & Smith, M. (1995). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Springer Dordrecht. doi:10.1007/978-94-015-8461-6
- Ashraf, M. F., Abd Aziz, M., Stanslas, J., & Kadir, M. A. (2013). Optimization of immersion frequency and medium substitution on microtuberization of *Chlorophytum borivillianum* in RITA system on production of saponins. *Process Biochemistry*, 48 (1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.001>
- Berthouly, M. & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En A. K. Hvoslef-Eide & W. Preil (eds.), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 165-195). Springer Netherlands.
- Cruz, H., Campos, G. V., Enríquez, J. R., Velasco, V. A., & Rodríguez, G. (2017). Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(2), 381–391. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.58>
- Cruz, H., Enríquez, J.R., Campos, G.V., Rodríguez, G., & Velasco, V.A. (2019). Desarrollo de plantas micropropagadas de *Agave americana* var. Oaxacensis durante su aclimatización en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(7), 1491–1503. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1625>
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J.L., Desjardins & Borroto, C.G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-751. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A. & Bley T. (2014). Review temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14, 607-621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). *Conociendo la Industria del Tequila y Mezcal*. Consejo Agropecuario de Jalisco.
- Murashige, T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., Bi, Y. M., & Rothstein, S. J. (2008). Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of experimental botany*, 59(11), 2933–2944. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern148>
- Pérez, J., Fonseca, M., Bahi, M. & Silva, J. (2020). *In vitro* multiplication of *Morus alba* L. Criolla variety in temporary immersion systems. *Pastos y Forrajes*, 43 (3), pp. 235-243.
- Robert M. L., Herrera-Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G., & Herrera-Alamillo, M. A. (2006). An Efficient Method for the Micropropagation of *Agave* Species. En V. M. Loyola & F. F. Vázquez, *Methods in Molecular Biology / Plant Cell Culture Protocols* (pp. 165-178). Humana Press.
- Rocano, M., Villena, P., & Peña, D. (2017). Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*. *Maskana*, 8(1),103–109. <https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.09>
- Rosales, C., Brenes, J., Salas, K., Arce-Solano, S., & Abdellour-Esquivel, A. (2018). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(1), 69-84. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.08.028.
- Salas, J. E., Agramonte, D., Jiménez-Terry, F., Pérez, M., Collado, R.; Barbón, R., La O, M., De Feria, M., Chávez, M. (2011). Propagación de plantas de *Morus alba* var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*, 11 (2), 77-88.
- Sánchez, A., Coronel-Lara, Z., Gutiérrez, A., Vargas, G., Coronado, M. L., & Esqueda, M. (2020). Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. En condiciones silvestres. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 15931605. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2403>
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Torres Morán, M. I., & Portillo, L. (2008). Micropropagación de *Agave tequilana* Weber cv. Azul: Problemas y perspectivas. *Scientia CUCBA*, 10, 7–20.

1.3 AVANCES EN LA CRIOBIOLOGÍA DE *Agave spp.*

Lourdes Delgado-Aceves¹, Liberato Portillo², Raquel Folgado³ y
María Teresa González-Arnao⁴*

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es presentar los avances logrados en la aplicación de la criopreservación a diferentes formas de cultivo *in vitro* de diversas especies de *Agave*. El método de vitrificación en criolamina resultó ser práctico y eficaz para aplicarlo a los embriones somáticos de *A. tequilana* cultivar 'Chato'. El mayor rebrote posterior a la criopreservación fue de 83% y la tasa de conversión a planta alrededor del 70% mediante la exposición se a la solución crioprotectora PVS2 a 0°C durante 15 min. Por otro lado, se presenta un protocolo exitoso para la criopreservación de meristemas apicales de *Agave peacockii*. La aplicación del método de gota-vitrificación fue efectivo, obteniéndose el 96 % de rebrote, mediante el precultivo de los meristemas apicales aislados de plantas *in vitro* en medio semisólido con sacarosa 0.3 M por 1 d o con el pre-acondicionamiento de las plantas donantes por 15 d en el medio con sacarosa, seguido del precultivo de los meristemas en medio líquido por 2 h. Los resultados descritos en este trabajo contribuyen a generar nuevas alternativas biotecnológicas para la conservación a largo plazo de los recursos genéticos de agave.

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad Biotecnología Vegetal, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México 45019.

² Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Zapopan, Jalisco, México 45200.

³ Huntington Library, Art Museum, and Botanical Gardens, San Marino, CA, USA 91108.

⁴ Universidad Veracruzana, Laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal, Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, México 94340.

*teregonzalez@uv.mx

PALABRAS CLAVE: Meristemas apicales, embriones somáticos, vitrificación, crioconservación.

Introducción

En los últimos años se han adaptado diversos métodos para la conservación a largo plazo del género *Agave* mediante técnicas de crioconservación (Delgado-Aceves *et al.*, 2021; 2022). La aplicación de estos procedimientos ha sido posible gracias a los avances en las técnicas de cultivo de tejidos y la determinación de condiciones adecuadas para la regeneración *in vitro* de plantas. La selección del material biológico a crioconservar se basa en el origen, disponibilidad, tamaño del explante y peculiaridades de cada especie (González-Arno & Engelmann, 2013).

De acuerdo con Frankel y Soule (1981), la conservación de las especies se logra sólo si se permite que la población evolucione, lo anterior se refiere a la posibilidad de continuar sus procesos de adaptación y especiación. Sin bien, antes de considerar una estrategia de conservación, se deben tomar en cuenta la viabilidad del sistema y las características fisiológicas de cada especie, para lo cual se necesita conocer su historia natural y aspectos genéticos (Doria, 2010). Los sistemas para la conservación del material biológico vegetal *in vitro* tienen amplias ventajas, ya que reduce el esfuerzo en mano de obra y costos que representan el mantenimiento, se evitan riesgos fitopatológicos y ambientales de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo* (Reed, 2008; Normah *et al.*, 2012; González-Arno & Engelmann, 2013). Particularmente, la crioconservación es una estrategia a largo plazo en la cual se almacena tejido u órganos (meristemas, embriones somáticos, semillas, polen) y, comparada con otras técnicas, presenta ventajas muy favorables en cuanto a la optimización de costos y procesos (Guillén *et al.*, 2015). Desde que el material se almacena en tanques con nitrógeno líquido, el espacio para mantener la colección resulta ser mucho menor, el costo para labores y mantenimiento es mínimo (solamente el llenado continuo del tanque) y, una vez almacenadas las

muestras, estas no se manipulan, lo que disminuye significativamente los costos (Villalobos & Engelmann, 1995).

El método más utilizado para la crioconservación del género *Agave* es la vitrificación, este método se caracteriza por inducir una intensa deshidratación osmótica mediante la exposición del material biológico a mezclas crioprotectoras muy concentradas, conocidas como formulaciones PVS (Plant Vitrification Solution). El tratamiento con las PVS facilita la ocurrencia de la transición vítrea durante el enfriamiento rápido de las muestras por la inmersión directa al nitrógeno líquido (Sakai & Engelmann 2007). Para que los tejidos vegetales adquieran mayor tolerancia frente a la deshidratación con la PVS y a la crioconservación, antes de estos dos procesos se realiza un tratamiento breve, el cual se denomina “tratamiento de carga” y en que se utiliza una mezcla de sacarosa glicerol, usualmente de 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol. Esta solución se subenfria fácilmente por debajo de -70°C y, cuando se enfría rápidamente se solidifica en un vidrio metaestable a aproximadamente -115°C . El proceso de calentamiento y retorno a la temperatura normal de cultivo se realiza siempre de forma rápida, con la finalidad de evitar que ocurra una recristalización (Matsumoto, 2017). El lavado de los crioprotectores se lleva a cabo con una solución que contiene las sales minerales del medio de cultivo y suplementada con 1.2 M de sacarosa (Sakai & Engelmann, 2007).

Con el fin de optimizar un protocolo y evitar algún daño en el tejido vegetal durante su manipulación, existen alternativas, como la encapsulación previa a la deshidratación del material (encapsulación-vitrificación), esta se logra a través de perlas de alginato de sodio polimerizadas con cloruro de calcio (CaCl_2), permitiendo que la desecación sea indirecta, haciéndola más lenta y paulatina (Singh *et al.*, 2007; Niino *et al.*, 2013). Como alternativa a este método, el uso de crio-láminas de aluminio para la encapsulación del tejido se lleva a cabo mediante una capa fina de alginato de calcio que se gelifica en la superficie de la misma lámina e inmoviliza los tejidos (Yamamoto *et al.*, 2012). Posteriormente, los tratamientos de carga y de deshidratación con la solución PVS se realizan acorde a lo descrito para el método

de vitrificación, pero el enfriamiento y el calentamiento con el protocolo de criolámina se llevan a cabo como lo contempla el método de gota-vitrificación (inmersión directa de las láminas al nitrógeno líquido para el enfriamiento y transferencia a la solución con 1.2 M de sacarosa a temperatura ambiente, para el calentamiento y descarga de los crioprotectores, respectivamente). Una característica común de las dos metodologías es que se benefician de las facilidades que proporciona la manipulación de abundante material inmovilizado en alginato de calcio, a diferencia del método de vitrificación, que implica el manejo directo de cada tejido. Otro beneficio es que se logra acortar la duración del protocolo criogénico completo, en comparación con el requerido para la encapsulación-deshidratación (Yamamoto *et al.*, 2012; González-Arno & Engelmann, 2013).

Materiales y métodos

Para el desarrollo de experimentos de criopreservación se utilizaron embriones somáticos de *Agave tequilana* cv. Chato y meristemas apicales de *A. peacockii* aislados de plantas *in vitro*. La ilustración de las técnicas de cultivo de tejidos utilizadas para generar el material biológico sometido a crioconservación se presenta en la **Figura 1**. Se aplicaron dos técnicas basadas en vitrificación: vitrificación por gotas para meristemas apicales y el método de crio-lámina para embriones somáticos. Se definieron las condiciones crioprotectoras que permitieron obtener los mayores niveles de recuperación y regeneración *in vitro* (%) de plantas a partir de los tejidos crioconservados.

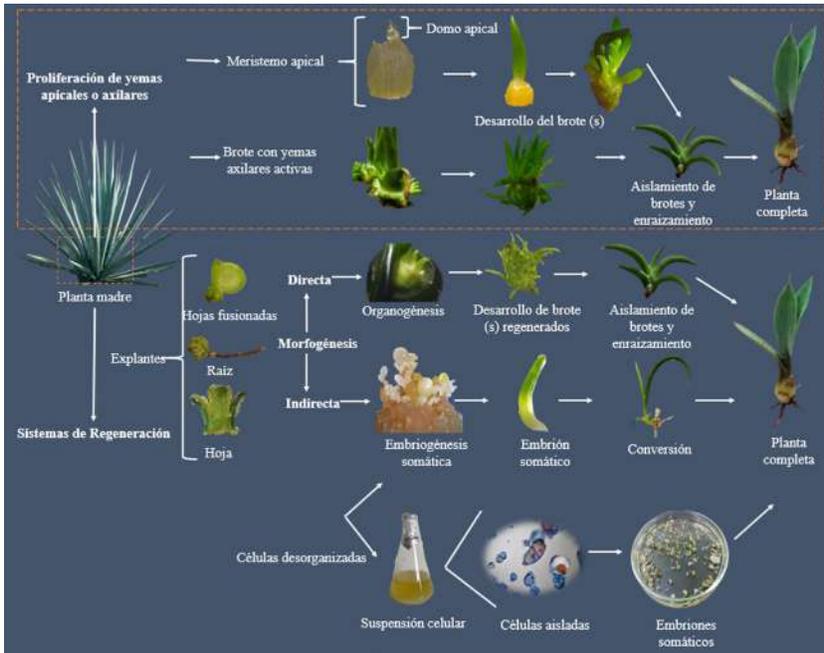


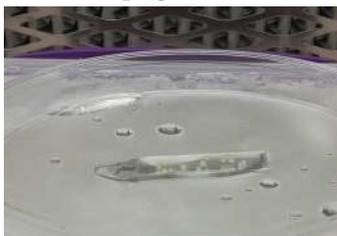
Figura 1. Esquematación de los métodos desarrollados para la micropropagación del género *Agave*

Resultados y discusión

En la Figura 1 se ejemplifican los métodos de micropropagación desarrollados en diferentes especies del género *Agave*. En general, tanto la organogénesis como la embriogénesis es promovida por un balance auxina/citocinina en el medio de cultivo, el resultado de los regenerantes dependerá de las concentraciones y estímulos exógenos a los que son sometidos los explantes, así como, especie y genotipos tratados (George, 2008). Las técnicas biotecnológicas desarrolladas en *Agave*, a partir de aislamiento de células, tejidos y órganos de plantas y el crecimiento de estos bajo condiciones controladas (*in vitro*), son un rango considerable de alternativas disponibles que varían ampliamente en sofisticación y en el tiempo necesario para producir resultados útiles. Los protocolos de criopreservación adaptados para cada forma *in vitro* de *Agave* estudiada se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Adaptación de protocolos para la criopreservación de meristemos apicales y embriones somáticos en *Agave* spp.

Material biológico	Protocolo de criopreservación
Meristemos apicales <i>Agave peacockii</i>	Gota-vitrificación: los meristemos apicales de 1 mm de largo × 1 mm de ancho se precultivaron en medio semisólido MS con sacarosa 0,3 M durante 1 día, se cargaron en solución con sacarosa 0,4 M y glicerol 1,6 M durante 20 min, se expusieron a la solución de vitrificación PVS2 durante 15 min, y sumergido en nitrógeno líquido en gotitas de PVS2 colocadas sobre tiras de papel de aluminio. Rebrote post-criopreservación 96% (Delgado-Aceves <i>et al.</i> , 2022).
Embriones Somáticos (ES) <i>A. tequilana</i> cv. ‘Chato’	Vitrificación-criolámina: ES (1–2 mm de longitud) en la etapa coleoptilar se precultivaron en medio semisólido MS con sacarosa 0,3 M durante 1 día. Los ES encapsulados en criolámina se expusieron a una solución de carga de sacarosa 1 M y glicerol 2 M durante 15 min, seguido de deshidratación con una solución de PVS y se sumergieron en nitrógeno líquido en criolámina. Rebrote en la post-criopreservación 83% (Delgado-Aceves <i>et al.</i> , 2021).



La criopreservación de meristemos apicales por el método de gota-vitrificación ha sido utilizada en otras especies de agave como *A. sobria* con un 87% (Tin & Folgado, 2019) y en *A. cupreata* con un 93% en el rebrote de los meristemos (Delgado-Aceves, 2022). Es preciso señalar que el desarrollo y tamaño de la planta *in vitro* suscita la obtención de meristemos apicales como protuberancias morfológicamente distinguibles (forma cónica en el centro del tallo cubierta por hojas jóvenes), lo anterior es clave para una disección correcta del área meristemática y con ello la calidad del explante sin daños en la zona central o periférica del domo meristemático (Sakai *et al.*, 2008).

En cuanto a avances en la conservación de otros materiales biológicos, se destaca la criopreservación de semillas y callo embriogénico en *Agave*. Con respecto a la criopreservación de semillas, estudios

preliminares en *A. salmiana* y *A. lechuguilla* demostraron que la inmersión directa en nitrógeno líquido resultó el método más conveniente para el almacenamiento a largo plazo de las semillas de las especies de *Agave* estudiadas obteniendo aproximadamente un 92% y 88% respectivamente en la germinación. (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2019). Por otro lado, la criopreservación del callo embriogénico en el género *Agave* sugiere el método de congelación por enfriamiento lento, donde la crioprotección se da con sulfóxido de dimetilo al 10% (vol/vol), congelación por enfriamiento lento (0,5 °C/min) y descongelación por calentamiento rápido (5 min en baño de agua mantenido a 37°C) (datos no mostrados).

El manejo de semillas y callos embriogénicos son protocolos que podrían considerarse debido a la variabilidad genética que presenta el material biológico, cuyo origen y viabilidad debe ser estudiado antes del proceso criogénico.

Conclusiones

La investigación desarrollada representa diferentes alternativas biotecnológicas disponibles para conservar eficientemente a largo plazo eficientemente diversos materiales biológicos y genotipos de agave. La técnica seleccionada dependerá del objetivo de estudio y especie de interés. La biología de la especie es clave para la selección de un sistema de regeneración apropiado para intereses en particular. Además, la preparación y establecimiento del material biológico del agave dependerá de la disposición y calidad que reporte la especie.

Referencias

- Cruz-Cárdenas, C. I., Contreras-Corona, M., Sandoval-Cancino, G. & González-Arno, M.T. (2019). Effect of drying and cryogenic temperatures on the physiological response of stored seeds of *Agave salmiana* and *Agave lechuguilla*. *Cryobiology*, *91*, 194 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.183>
- Delgado-Aceves, L., González-Arno, M.T., Santacruz-Ruvalcaba, F., Folgado, R. & Portillo, L. (2021). Indirect Somatic Embryogenesis and Cryopreservation of *Agave tequilana* Weber Cultivar 'Chato'. *Plants*, *10*, 249. <https://doi.org/10.3390/plants10020249>
- Delgado-Aceves, L., Portillo, L., Folgado, R., Romo-Paz, F.J. & González-Arno, M.T. (2022). New approaches for micropropagation and cryopreservation of *Agave peacockii*, an endangered species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *150*, 85-95. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02246-z>
- Delgado-Aceves, M.L. (2022). *Desarrollo de estrategias para el cultivo in vitro y criopreservación de especies de Agave (A. tequilana cultivar 'Chato', A. peacockii y A. cupreata* [tesis de doctorado, Universidad de Guadalajara]. Repositorio Institucional U de G.
- Doria, J. (2010). A general information on seeds: Its production, preservation and storage. *Cultivos Tropicales*, *31*, 74-85.
- Frankel, O.H. & Soule, M.E. (1981). *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press.
- George, E.F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure-Background. En E. F. George, M. A. Hall & G. J. De Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (1-28). Springer.
- González-Arno, M.T. y Engelmann, F. (2013). *Criopreservación de plantas en América Latina y el Caribe*. IICA.
- Guillén, S., Martínez-Palacios, A. Martínez, H. & Martínez-Ávalos, J. G. (2015). Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences*, *93*(2), 1-10. <https://doi.org/10.17129/botsci.129>
- Matsumoto, T. (2017). Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, *5*, 13-20. <https://doi.org/10.7831/ras5.13>

- Niino, T., Yamamoto, S., Fukui, K., Castillo-Martínez, C.R., Valle, M., Matsumoto, T. y F. Engelmann, F. (2013). Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. *CryoLetters*, 34, 549-560.
- Normah, M. Chin, H. y B.M. Reed. B. M. (2012). *Conservation of tropical plant species*. Springer Science and Business Media.
- Sakai, A. y F. Engelmann. F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. *CryoLetters*, 28, 151-172.
- Sakai, A., Dai, H. & T. Niino. (2008). Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols. En B. M. Reed (ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide* (33-57). Springer Science.
- Singh, B., Sharma, S., Rani, G., Virk, G. S., Zaidi, A. A. & Nagpal, A. (2007). In vitro response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* tenora). *Plant Biotechnology Reports*, 1 (2), 101-107. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0015-6>
- Tin, J. & Folgado, R. (2019). Applied Cryobiotechnology for the Long-Term Conservation of *Agave sobria* spp *frailensis*. En A. Gutiérrez, B. Rodríguez-Garay, M. Estarrón-Espinosa, A. Gschaedler-Mathis, M. Kirchmayr, R. Moreno-Terrazas, P. Camacho-Ruiz, R. Ortiz-Basurto, R. Aguilar-Uscanga, M. Aguilar-Juárez, O. Gallardo-Valdez, J. Hernández-López, & E. Sánchez-Osorio, *Integral and sustainable use of Agave* (pp. 15-20). CONACYT/CIATEJ/Agared.
- Villalobos, V. M., & Engelmann, F. (1995). Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 375-382. <https://doi.org/10.1007/BF00364612>
- Yamamoto, S., Rafique, T., Fukui, K., Sekizawa, K. & Niino, T. (2012). V-Cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: Case study of mint cryopreservation. *CryoLetters*, 33, 12-23.

1.4 PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Agave potatorum* (TOBALÁ) MEDIANTE ORGANOGÉNESIS AXILAR Y CALLOGÉNESIS EN MEDIO SÓLIDO

Enrique Rodríguez de la Garza¹, Mauro A. Salazar Muñoz¹, Fátima Gutiérrez Tenorio^{1,2}, Daniela Magallanes Enríquez¹, Alejandro González Rodríguez¹ y César A. Puente Garza^{1*}

RESUMEN

La producción masiva de mezcal y la reducción en las poblaciones silvestres de *Agave potatorum* convergen en un proceso insostenible que amenaza la supervivencia de la especie. En respuesta, se propuso una metodología de micropropagación para satisfacer una producción masiva de plantas, estudiando el efecto de los fitorreguladores (FR) bencilaminopurina (BAP) (10 mg/L), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (3 mg/L) y ácido naftalenacético (NAA) (3/ mg/L) en la formación de brotes y de callo luego de 6 semanas. Se obtuvo un porcentaje de inducción de brotes de 75%, con una longitud promedio 1.9 cm por brote, así como una capacidad de formación de brotes (BFC) de 6.94 al usar BAP. Además, se consiguió un porcentaje de inducción de callo de 67% y 75%, así como una masa de callo de 1.13 y 0.15 g, al emplear 2,4-D y NAA, respectivamente. Con este método es posible propagar *A. potatorum* e inducir brotes y callo, y con ello proveer material vegetal estandarizado para la producción de mezcal.

PALABRAS CLAVE: *Agave potatorum*; fitorregulador, micropropagación, organogénesis, callogénesis.

¹ Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, México 64849.

² Technische Universität Dresden, Trefftz-Bau, Zellescher Weg 16, Dresden, Alemania 01069. * ca.puente@tec.mx

Introducción

El género *Agave* está compuesto por plantas monocotiledóneas monocárpicas pertenecientes a la familia *Asparagaceae*, nativas del continente americano. Este género comprende entre 200 y 247 especies, de las cuales 75% pueden encontrarse en México, y 69% se consideran endémicas del territorio nacional (García Mendoza, 2002). A lo largo del país los agaves son utilizados en múltiples actividades, pero la producción de bebidas alcohólicas es, sin duda, la más importante en términos económicos (Torres-García *et al.*, 2019).

Este trabajo se enfoca en *Agave potatorum* o Tobalá, una especie endémica de los estados de Puebla y Oaxaca que se desarrolla en climas desérticos y semidesérticos a altitudes de entre 1,300 y 2,400 msnm (García Mendoza, 2010); toma entre 8 y 12 años para generar inflorescencia y no presenta reproducción asexual (Félix-Valdez *et al.*, 2016). Esta especie posee un alto valor cultural y económico para comunidades rurales debido a su uso como fuente de alimento, medicina, combustible, forraje, material constructivo e incluso como controlador de la erosión del suelo (Lara-Ávila & Alpuche-Solís, 2016), aunque su uso más importante es el de materia prima para la elaboración de mezcal (Meza *et al.*, 2017), una bebida espirituosa que representa un mercado de alrededor de 118 millones de dólares, y concentra casi 5,900 hectáreas de superficie cultivada (SIAP, 2021). Lo anterior, convierte a *A. potatorum* y su destilado en una fuente significativa de ingresos para las familias que se dedican a su cultivo (Félix-Valdez *et al.*, 2016).

Entre 2011 y 2022 la producción anual de mezcal en México incrementó desde aproximadamente 1 millón hasta 8 millones de litros, debido al crecimiento de su popularidad dentro y fuera del país, con lo cual ha aumentado también la demanda de la materia prima para su producción (Arellano-Plaza *et al.*, 2022). En el caso de *A. potatorum*, la búsqueda de satisfacer esta demanda global ha llevado a los productores a priorizar su cosecha como materia prima sobre su uso para propósitos de reproducción, lo cual ha causado un declive en las poblaciones silvestres de esta planta en su rango nativo (Rangel-Landa

et al., 2015), por lo que las prácticas agrícolas actuales podrían poner en peligro a la especie (Félix-Valdez *et al.*, 2016). Derivado de esto, múltiples esfuerzos han sido registrados a lo largo de los años para la protección de *A. potatoorum*, incluyendo planes de reforestación (Torres-García *et al.*, 2013), estrategias de preservación (Torres *et al.*, 2015) y el desarrollo de análisis demográficos y de recuperación (Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

Diversas estrategias de micropropagación *in vitro* han sido propuestas como una solución por su capacidad de producir plantas saludables y de alta calidad. Estas técnicas han probado ser efectivas para la propagación de múltiples especies del género, incluyendo *A. peacockii*, *A. guineola*, *A. americana*, *A. tequilana*, *A. fourcroydes* y *A. potatoorum* (Chávez-Ortiz *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2014; Delgado-Aceves *et al.*, 2022; Garriga Caraballo *et al.*, 2010; Reyes-Zambrano *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2011), en procesos donde se ha reportado el uso de fitorreguladores (FR) como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA) y bencilaminopurina (BAP) (Barreto *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014; Monja-Mio & Robert, 2013). Por lo tanto, la propagación *in vitro* usando FR representa una alternativa a las prácticas agronómicas tradicionales para la reproducción masiva de *A. potatoorum*.

En este trabajo se evalúa un método de micropropagación *in vitro* de *A. potatoorum* mediante organogénesis directa y callogénesis, utilizando medio sólido y FR. Como resultado, se indujo con éxito la formación de brotes axilares y diferentes tipos de callo específicos de cada tratamiento.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se obtuvieron 300 semillas de *Agave potatoorum* Zucc. de “Loma Noble Agaves” (Oaxaca, México) para la etapa de germinación. La desinfección de las semillas se desarrolló de acuerdo con reportes previos: fueron lavadas con Tween20 (Thermo Fisher Scientific) y agua

corriente por dos minutos, luego sumergidas en etanol al 70% por dos minutos y posteriormente en hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos, para finalmente ser enjuagadas tres veces con agua destilada (Chen *et al.*, 2014; Puente-Garza *et al.*, 2015).

Para la germinación, las semillas fueron sujetas a escarificación mecánica y luego colocadas en medio de germinación (0.44 g/L Murashige y Skoog, 12 g/L agar, pH 5.75-5.85) a 30°C con un fotoperiodo de 12:12 (luz/oscuridad). Luego de dos semanas, las plántulas fueron transferidas a un medio de propagación (4.4 g/L Murashige y Skoog, 30 g/L sacarosa, 4 g/L Phytigel, pH 5.75-5.85) y se cultivaron bajo las mismas condiciones. Un total de 88 plantas fueron obtenidas del proceso de germinación, de las cuales 48 fueron elegidas aleatoriamente para su ingreso a los tratamientos.

Tratamiento

Se distribuyeron 12 plantas de un mes de edad a cada tipo de tratamiento, conformados por medio de propagación adicionado con 3 mg/L de 2,4-D (Phyto Technology Laboratories), 3 mg/L de NAA (Sigma-Aldrich) o 10 mg/L de BAP (Sigma-Aldrich). Las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperíodo de 12:12 (luz/oscuridad) a 6600 lux y 30°C por 6 semanas.

Evaluación fenotípica

La masa del callo fue determinada mediante el pesaje de los callos extirpados en una balanza granataria (Sartorius ED423S-CW Extend Precision Balance, 420 x 0.001 g). La longitud y número de brotes fueron determinados manualmente por medición y conteo. La capacidad de formación de brotes (BFC) fue definida, de acuerdo con Valenzuela-Sánchez *et al.* (2006), como el producto del número promedio de brotes por explante y el porcentaje de explantes que formaron brotes. Todas las mediciones se realizaron al finalizar el tratamiento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo en el software Minitab 19. La significancia estadística fue evaluada utilizando un ANOVA de un factor, mientras que la diferencia entre las medias fue evaluada mediante la prueba de Dunnett, ambos con $\alpha=0.05$.

Resultados y discusión

Germinación y establecimiento de las plantas

El protocolo de germinación resultó en una tasa de germinación del 29%, generando 88 plántulas saludables con radícula y mostrando su primera hoja verdadera. Tras el pase al medio de propagación, las plantas desarrollaron fenotipos similares, lo que facilitó la selección aleatoria para el posterior ingreso a los tratamientos. Se han registrado anteriormente porcentajes de germinación de entre 30 y 50% para diferentes especies de *Agave*, lo que vuelve congruente el valor obtenido en este estudio. Por su parte, la variación en la tasa de germinación ha sido atribuida previamente a la dormancia de las semillas, que puede ser afectada por las condiciones de almacenamiento posterior a su recolección (Peña Valdivia *et al.*, 2006). Otros autores han relacionado un bajo porcentaje de germinación al espacio geográfico donde se desarrolló la planta madre, que puede afectar parámetros fenotípicos en las semillas que a su vez se relacionan con la germinación; un ejemplo de estos es la pérdida de luminosidad y del contenido de lípidos, previamente relacionados con una reducción en el potencial germinativo de las semillas (Ortíz Hernández *et al.*, 2018).

Micropropagación

Se observaron dos efectos derivados de los tratamientos: la formación de brotes o de callos (**Figura 1**). El tratamiento con BAP promovió el desarrollo de brotes axilares, obteniendo así un porcentaje de inducción de brotes del 75% y un promedio de 9 ± 8 brotes por planta. Por

otro lado, los tratamientos con 2,4-D y NAA produjeron fenotipos distintos de callo en la base de las plantas, resultando en porcentajes de inducción de callo de 67% y 75%, respectivamente (**Tabla 1**).



Figura 1. *Agave potatorum* micropropagado bajo tratamientos con 3 mg/L de 2,4-D (1), 3 mg/L de NAA (2) y 10 mg/L de BAP (3) después de 6 semanas

La tasa de supervivencia fue calculada en términos de tolerancia al tratamiento después de las etapas de germinación y propagación (**Tabla 1**). Tanto el control como el tratamiento con NAA presentaron una tasa de supervivencia del 100%, mientras que los tratamientos con 2,4-D y BAP presentaron la pérdida de plantas, resultando en tasas de supervivencia de 67% y 92%, respectivamente. El efecto negativo del 2,4-D en la supervivencia de los explantes podría ser atribuible a la inducción de desarrollo de tejido pobremente diferenciado y antagonismo al desarrollo de órganos que caracteriza a las auxinas sintéticas (Lecona Guzmán *et al.*, 2017).

Tabla 1. Evaluación fenotípica en los tratamientos de micropropagación de *A. potatorum* a las 6 semanas

Tratamiento	% supervivencia	% inducción de brotes	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	% inducción de callos	Masa de callo (g)
Control	100 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2-4 D	67 ± 49 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	67 ± 49 ^b	1.13 ± 0.99 ^b
NAA	100 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	75 ± 45 ^b	0.15 ± 0.31 ^a
BAP	92 ± 29 ^a	75 ± 45 ^b	9.25 ± 8.44 ^b	1.9 ± 1.18 ^b	0 ^a	0 ^a

Se usó un número de muestra de 12 plantas por tratamiento. Los valores representan la media ± desviación estándar, y las letras denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

En el proceso de organogénesis directa, la formación de brotes fue inducida en los explantes sometidos al tratamiento con BAP, sin crecimiento de callos. Los brotes se presentaron como tejido foliar turgente y elongado, conectado a la base de la planta madre. En ocasiones presentando más de una hoja por brote y en todos los casos caracterizados por la ausencia de espinas; los brotes presentaron una longitud media de 1.9 cm (**Tabla 1**). Adicionalmente, se obtuvo para este tratamiento un BFC de 6.94, que representa un valor menor al reportado por Valenzuela *et al.* (2006) en *A. tequilana*.

Correa-Hernández *et al.* (2022) reportaron también la obtención de brotes axilares en ensayos de micropropagación de *A. potatorum* comparando la efectividad de medio sólido contra líquido, incorporado en un sistema de inmersión temporal (SIT) de frascos gemelos; en ambos adicionando al medio 3 mg/L de BAP, ácido ascórbico y cisteína. El medio sólido consiguió un promedio de seis brotes por planta (BPP), ligeramente menor al promedio de 9 BPP obtenido en el presente estudio. Ambos resultados son superados por el SIT, con el que se obtuvieron 28 BPP, que fueron, además, más largos que los obtenidos por medio sólido, aunque mostrando un aumento de alrededor del 400% en la hiperhidricidad de los explantes y brotes.

Martínez-Palacios *et al.* (2003) observaron, por su parte, en *A. victoriae-reginae* un aumento significativo en la diferenciación de brotes axilares a través de la adición de BAP, reportando un incremento de 1 a 2 BPP de 1cm de longitud al aumentar la concentración de BAP de 0.5 a 2 mg/L. Un efecto similar fue reportado en *A. marmorata* Roelz, donde la adición de 5 mg/L de BAP indujo un promedio de 2.5 BPP en medio sólido, con longitud media de 1 cm (Martínez-Martínez *et al.*, 2021). En el presente estudio con *A. potatorum* reportamos la inducción de 9 brotes con 2 cm de longitud por planta, a través de una concentración de BAP cinco veces mayor a la usada en *A. victoriae-reginae* y dos veces mayor a la usada en *A. marmorata* Roelz. Esto indica que el límite superior del rango de concentraciones de BAP, en el cual se obtiene una respuesta positiva de organogénesis en *A. potatorum*, es más amplio.

En contraste con los resultados obtenidos usando BAP, los tratamientos con NAA y 2,4-D indujeron la formación de callos en los explantes. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la tasa de inducción de callo, pero sí en cuanto a la masa de tejido calloso que generaron. En promedio, el tratamiento con 2,4-D indujo la producción de 1.13 g de callo, mientras que el tratamiento con NAA resultó en 0.15 g (**Tabla 1**). Adicionalmente, el fenotipo de los callos generados fue claramente diferente entre tratamientos: los callos inducidos por NAA presentaron un color amarillento y textura friable, a menudo presentando la formación de tejido radicular en las masas de mayor tamaño, mientras que los callos inducidos por 2,4-D fueron más compactos, aunque aún friables en los bordes, con un color blanco cremoso y ocasional presencia de secciones clorofílicas.

El efecto callogénico de las auxinas observado en este trabajo también ha sido reportado en estudios con otras especies de *Agave*. Reyes-Zambrano *et al.* (2016) probaron el efecto de BAP y 2,4-D para la generación de callos en explantes meristémicos de *A. americana*, identificando una tendencia de aumento en la inducción de masas callosas al incrementar la concentración de la auxina en un rango de entre 0.025 y 0.5 mg/L. Esta misma tendencia es reportada para ex-

plantas tanto de hoja como de tallo por Martínez-Palacios *et al.* (2003) en su trabajo con *A. victoriae-reginae*, al aumentar la concentración de 2,4-D de 0.1 a 0.5 mg/L, aunque reportando necrosis severa al llegar a 1 mg/L. Chávez-Ortiz *et al.* (2021) reportaron resultados similares en *A. guineola* Gentry, donde la adición de 0.1 a 1 mg/L de 2,4-D indujo siempre callogénesis, pero mostró nuevamente una tendencia a generar necrosis en las concentraciones más altas. Los resultados de estos estudios concuerdan con los presentados en este trabajo respecto a la inducción de callo, pero difieren respecto a las afecciones a los explantes, puesto que la concentración de 3 mg/L de 2,4-D no generó necrosis en *A. potatorum*, aunque sí redujo significativamente su porcentaje de supervivencia.

Otros estudios también han evaluado el uso de NAA en conjunto con otros FR para el desarrollo de callos. Tejavathi *et al.* (2007) reportaron la inducción de callos nodulares embriogénicos de color verde cremoso en *A. veracruz* Mill. utilizando 1 mg/L de NAA, así como 1 mg/L de 2,4-D. Otro estudio demostró una relación proporcional entre el aumento en la concentración de NAA y el crecimiento de callo inducido a partir de tejido meristemático de *A. tequilana*, obteniendo los mejores resultados con una concentración de aproximadamente 0.97 mg/L (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006). Por otro lado, Zhang *et al.* (2013) reportan en su trabajo con el híbrido de *Agave* H.11648 (*A. angustifolia* × *A. amaniensis*) una inducción exitosa de callo mediante la combinación de 3 mg/L de BAP con 1 mg/L de NAA, el cual presentó una apariencia amarilla-verdosa y textura friable. Estos reportes concuerdan con los resultados presentados para *A. potatorum* en términos de la efectividad de 2,4-D y NAA para la inducción de callo y los respectivos fenotipos que estos generan, aunque presentan también la posibilidad de probar estos reguladores en combinación con citocininas para mejorar la tasa de inducción de callogénesis.

Conclusiones

Con el objetivo de establecer un balance entre la producción masiva de mezcal y la reproducción natural de *A. potatorum*, se empleó una estrategia de micropropagación *in vitro* para evaluar su efectividad en este entorno. Como resultado, se logró inducir organogénesis directa por brotes axilares usando 3 mg/L de BAP; al igual que se consiguió callogénesis al emplear 3 mg/L de 2,4-D y de NAA.

A pesar de los resultados obtenidos, aún es necesario profundizar en la investigación relacionada a la micropropagación de *A. potatorum*. Una recomendación es el empleo de SIT, ya que la literatura los sugiere como una opción eficiente para la formación de brotes. Además, es necesario determinar las concentraciones y combinaciones de FR óptimas para lograr mejores formulaciones de medios de cultivo. Finalmente, consideraciones adicionales como las condiciones de cultivo, el uso de diferentes FR, la adición de elementos sinérgicos para el crecimiento de las plantas, aclimatación en invernadero, así como estudios con mayor tamaño de muestra son necesarios para optimizar el método propuesto en este trabajo, y con ello generar un protocolo efectivo para la reproducción masiva de *Agave potatorum* mediante micropropagación *in vitro*.

Referencias

- Arellano-Plaza, M., Paez-Lerma, J. B., Soto-Cruz, N. O., Kirchmayr, M. R., & Gschaedler Mathis, A. (2022). Mezcal Production in Mexico: Between Tradition and Commercial Exploitation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2022.832532>
- Barreto, R., Nieto-Sotelo, J., & Cassab, G. I. (2010). Influence of plant growth regulators and water stress on ramet induction, rosette engrossment, and fructan accumulation in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 93–101. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9758-9>
- Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún,

- A., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). In Vitro Propagation of *Agave guineola* Gentry Using Semisolid Medium and Temporary Immersion Bioreactors. *Phyton*, 90(3), 1003–1013. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>
- Chen, Y., Chen, X., Hu, F., Yang, H., Yue, L., Trigiano, R. N., & Cheng, Z.-M. (Max). (2014). Micropropagation of *Agave americana*. *HortScience*, 49(3), 320–327. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.3.320>
- Delgado-Aceves, L., Portillo, L., Folgado, R., Romo-Paz, F. J., & González-Arno, M. T. (2022). New approaches for micropropagation and cryopreservation of *Agave peacockii*, an endangered species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(1), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02246-z>
- Delgado-Lemus, A., Casas, A., & Téllez, O. (2014). Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: Bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-63>
- Félix-Valdez, L. I., Vargas-Ponce, O., Cabrera-Toledo, D., Casas, A., Cibrian-Jaramillo, A., & de la Cruz-Larios, L. (2016). Effects of traditional management for mescal production on the diversity and genetic structure of *Agave potatorum* (Asparagaceae) in central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(7), 1255–1271. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0315-6>
- García Mendoza, A. (2002). Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal*, 74 (4), 177–187.
- García Mendoza, A. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): Nuevas taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*, 91, 71-93. <https://doi.org/10.21829/abm91.2010.292>
- Garriga Caraballo, M., González Oramas, G., Alemán García, S., Abreu Cruz, E., Quiroz Bravo, K., D. S. Caligari, P., & García-González, R. (2010). Management of Auxin-Cytokinin Interactions to Improve Micropropagation Protocol of Henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4),

- 545–551. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000400003>
- Lara-Ávila, J. P., & Alpuche-Solís, Á. G. (2016). Análisis de la diversidad genética de agaves mezcaleros del centro de México. *Revista fitotecnía mexicana*, 39(3), 323-330. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000300323&lng=es&tlng=es.
- Lecona Guzmán, C. A., Reyes Zambrano, S., Barredo Pool, F. A., Abud Archila, M., Montes Molina, J. A., Rincón Rosales, R., & Gutierrez Miceli, F. A. (2017). In Vitro Propagation of *Agave americana* by Indirect Organogenesis. *Hort Science*, 52(7), 1–5. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI10498-16>
- Martínez-Martínez, S. Y., Arzate-Fernández, A. M., Álvarez-Aragón, C., Martínez-Velasco, I., & Norman-Mondragón, T. (2021). REGENERATION OF *Agave marmorata* Roelz PLANTS IN TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS, VIA ORGANOGENESIS AND SOMATIC EMBRYOGENESIS. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(3), Article 3. <https://doi.org/10.56369/tsaes.3472>
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M., & Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), 135–142. <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Meza, D. E. E., González, G. R., & Ángeles, B. E. M. (2017). Caracterizando la producción y organización de los mezcaleros en Matatlán, México “Capital mundial del mezcal.” *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 27(50), Article 50. <https://doi.org/10.24836/es.v27i50.465>
- Monja-Mio, K. M., & Robert, M. L. (2013). Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. Through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(5), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Ortíz Hernández, Y. D., Gutiérrez Hernández, G. F., Corzo Ríos, L. J., García Ramírez, E., & Martínez Tomás, S. H. (2018). Varietal and germinative characterization of *Agave potatorum* (Asparagaceae)

- seeds with different origins. *Botanical Sciences*, 96(4), 628–639. <https://doi.org/10.17129/botsci.1914>
- Peña Valdivia, C. B., Sánchez Urdaneta, A. B., Aguirre, R., Trejo, C., Cárdenas, E., & Villegas, M. (2006). Temperature and mechanical scarification on seed germination of ‘maguey’ (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *International Seed Testing Association 2006*, 34, 47–56.
- Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A., & García-Lara, S. (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01026>
- Rangel-Landa, S., Casas, A., & Dávila, P. (2015). Facilitation of *Agave potatorum*: An ecological approach for assisted population recovery. *Forest Ecology and Management*, 347, 57–74. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.03.003>
- Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzmán, C. A., Barredo-Pool, F. A., Ambrosio Calderón, J. D., Abud-Archila, M., Rincón-Rosales, R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2016). Plant growth regulators optimization for maximize shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogenesis. *Gayana. Botánica*, 73(1), 124–131. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432016000100014>
- Ruiz, S., Adriano, L., Ovando, I., Navarro, C., & Salvador, M. (2011). Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: Effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 10(47), 9623–9630. <https://doi.org/10.5897/AJB11.641>
- Servicio de Información Agroalimentaria y PesqueraSIAP. (2021). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola—Agaves mezcaleros*. Anuario Estadístico de La Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tejavathi, D. H., Rajanna, M. D., Sowmya, R., & Gayathamma, K. (2007). Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(5), 423–428. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9088-8>
- Torres, I., Casas, A., Vega, E., Martínez-Ramos, M., & Delgado-Le-

- mus, A. (2015). Population Dynamics and Sustainable Management of Mescal Agaves in Central Mexico: *Agave potatorum* in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. *Economic Botany*, 69(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9295-2>
- Torres-García, I., Casas, A., Delgado-Lemus, A., & Rangel-Landa, S. (2013). Aprovechamiento, demografía y establecimiento de *Agave potatorum* en el Valle de Tehuacán, México: Aportes ecológicos y etnobiológicos para su manejo sustentable. *Zonas Áridas*, 15, 92–109. http://www.lamolina.edu.pe/zonasaridas/za15/RZA15_completo.pdf#page=92
- Torres-García, I., Rendón-Sandoval, F. J., Blancas, J., Casas, A., & Moreno-Calles, A. I. (2019). The genus *Agave* in agroforestry systems of Mexico. *Botanical Sciences*, 97(3), 263. <https://doi.org/10.17129/botsci.2202>
- Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42(4), 336–340. <https://doi.org/10.1079/IVP2006788>
- Zhang, Y.-M., Li, X., Chen, Z., Li, J.-F., Lu, J.-Y., & Zhou, W.-Z. (2013). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Agave* hybrid, No. 11648. *Scientia Horticulturae*, 161, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.047>

1.5 ANATOMÍA, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y GENÓMICA DE LAS FIBRAS DE *Agave spp.*

Dalia C. Morán-Velázquez¹, Luis F. Maceda-López¹, Lorena Rodríguez-López¹, Francisco Vilaplana² y Fulgencio Alatorre-Cobos^{1,3*}

RESUMEN

Los agaves constituyen una fuente importante de fibras duras a nivel mundial. Su uso tradicional como materia textil se ha diversificado actualmente hacia la nanotecnología, medicina, industria automotriz y aeronáutica. En este trabajo se revisa brevemente el estado del arte sobre lo que se sabe de la anatomía, clasificación y composición química de las fibras de distintas especies de agave. Finalmente, se enfatizan los avances sobre genes clave en el metabolismo de pared celular de fibras de agave hallados por enfoques de secuenciación masiva de expresión y su uso en mejoramiento genético.

PALABRAS CLAVE: Agaves, fibras, anatomía, composición química, transcriptómica.

¹ Conahcyt-Colegio de Postgraduados Campus Campeche, Carretera Haltun-chén-Edzná km 17.5, Sihochac, 24450, Campeche, México.

² Division of Glycoscience, Department of Chemistry, School of Engineering Sciences in Chemistry, Biotechnology and Health, KTH Royal Institute of Technology, SE-100 44 Stockholm, Sweden.

³ Adscripción actual: Conahcyt-Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 × 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo, 97205, Mérida, Yucatán, México.

*fulgencio.alatorre@cicy.mx

Agaves como fuentes de fibras duras: usos de las fibras y especies usadas actualmente

Los agaves o magueyes han sido, tradicionalmente, una fuente de fibras naturales en el Nuevo mundo; actualmente su cultivo y uso están expandidos también a África y Asia, principalmente. Se emplean principalmente para la elaboración de cuerdas, sacos, tapetes, alfombras, redes de pesca, cepillos, papel, rellenos de colchones, entre otros.

En la actualidad, los agaves se emplean en la elaboración de biopolímeros destinados a vivienda e industrias automotriz y aeronáutica, y en la industria tequilera y mezcalera, las fibras de hoja son subproducto valioso para la elaboración de bioetanol (Escamilla-Treviño *et al.*, 2012; Hulle *et al.*, 2015; Pérez-Pimienta *et al.*, 2017). Las fibras obtenidas de agaves o magueyes, especialmente aquellas obtenidas de *Agave sisalana*, el híbrido H11648 (*A. amaniensis* Trel and Nowell \times *A. angustifolia* Haw \times *A. amaniensis*), *A. lechuguilla* y *A. fourcroydes* (Figura 1) tienen una importancia mundial por la superficie sembrada y valor económico y social (Robert *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2019). De acuerdo a datos de la FAO, en 2021 existían 236,481 ha sembradas con *A. sisalana* o sisal, concentradas principalmente en Brasil, Tanzania, Kenia, Madagascar y China, con una producción conjunta de 220,375 toneladas. Por su parte, el cultivo de *A. fourcroydes* o henequén se restringe a México, casi exclusivamente al estado de Yucatán, aunque datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2019) también reportan áreas sembradas en Tamaulipas. En Yucatán, el henequén es un cultivo emblemático, íntimamente ligado a la historia y cultura de los mayas. Desde 1883 y hasta principios de 1900 el auge de las haciendas henequeneras sustentó el crecimiento económico de dicho estado (Zuleta & Orensanz, 2004). La aparición de las fibras naturales y cambios en las políticas nacionales llevaron a este cultivo casi a la extinción. Recientemente, cobijado por el interés mundial creciente en fibras naturales y la inversión extranjera, existe un incipiente incremento en las superficies sembradas de henequén en nuestro país. Para 2019 el SIAP reportó 8,678 ha sembradas distribuidas en 48 municipios de Yucatán. Aunque la comercialización a escala nacional

y mundial de fibras de agaves solo incluyen aquellas de sisal, henequén (Figura 1A-C) y el H11648 (Figura 1D), la obtención tradicional de fibras se puede realizar en muchas otras especies.

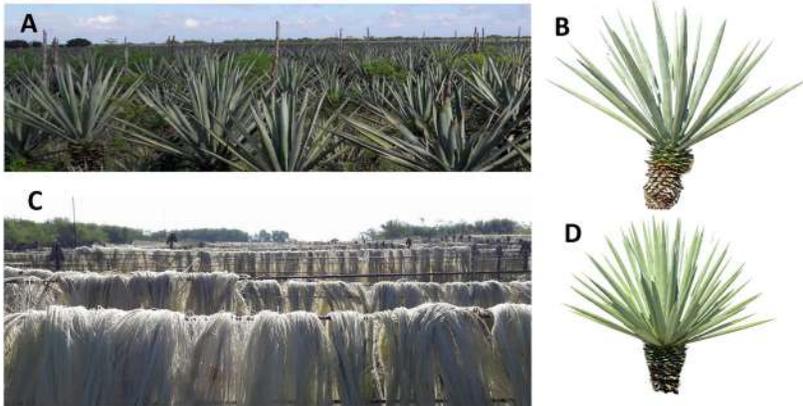


Figura 1. Henequén e híbrido H11648 en Yucatán, México. **A)** Cultivo de henequén en la Hacienda Santa Rosa, **B)** Planta de henequén, **C)** Fibras de henequén secándose al sol, **D)** Planta del híbrido H11648.

En el centro y norte de México y sur de Estados Unidos la extracción y utilización de fibras de agaves por los grupos originarios o nativos es sumamente antigua y se aprovechan una amplia diversidad de agaves. En la tabla 1 se enlistan 66 especies que se han reportado como fuente de fibras. No obstante, esta cantidad considerable de especies, pocas han sido empleadas en programas de mejoramiento genético con fines de calidad de la fibra. Para la generación de los híbridos H11648, H1300, Mlola 1, Mlola 487 y la mutante Hildana se han usado *A. amaniensis*, *A. angustifolia* o *A. sisalana* como progenitores. Considerando la poca cantidad de materiales mejorados, las 66 especies de la tabla 1 constituyen un acervo genético muy valioso para los programas de mejoramiento genético de agaves; su uso promovería además su revalorización y conservación ante el riesgo de extinción por sobreexplotación, saqueo y cambios de uso de suelo que enfrentan muchas de ellas (Alducin-Martínez *et al.*, 2023).

Tabla 1. Especies de agave usadas como fuente de fibras

Especie	Referencias
<i>A. amaniensis</i> Trel. & Nowell	De Barros Salgado, 1979
<i>A. americana</i> L.	McLaughlin y Schuck, 1991; Parra Negrete <i>et al.</i> , 2010; Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. albopilosa</i> I. Cabral, Villareal & A. E. Estrada	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. angustifolia</i> Haw.	Parra Negrete <i>et al.</i> , 2010
<i>A. aplanata</i> Lem. ex Jacobi	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. atrovirens</i> Karw.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. asperrima</i> Jacobi	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. aurea</i> Brandegee	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. angustiarum</i> Trel.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. bovicornuta</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. bracteosa</i> S.Watson ex Engelm.	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. cantala</i> (Haw.) Roxb. Ex Salm-Dyck	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. cerulata</i>	Nobel, 1998
<i>A. celsii</i> Hook	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010.
<i>A. cocui</i> Trel.	Díaz <i>et al.</i> , 2018
<i>A. chrysantha</i> Peebles	McLaughlin y Schuck, 1991; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. difformis</i> A. Berger	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. delamateri</i> W. C. Hodgs & Slauson	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. deserti</i> Elgem.	McLaughlin y Schuck, 1991; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. cerulata</i> Trel.	McLaughlin y Schuck, 1991; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. falcata</i> Engelm.	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010.
<i>A. funkiana</i> Koch & Bouch	McLaughlin y Schuck, 1991; Colunga-García-Marín <i>et al.</i> , 2015; Kozen y Netravali, 2014

<i>A. fourcroydes</i> Lem.	McLaughlin y Schuck, 1991; Parra Negrete <i>et al.</i> , 2010; Colunga-GarcíaMarín <i>et al.</i> , 2015
<i>A. garcia-mendozae</i> Galván & Hern.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. geminiflora</i> (Tagl.) Ker Gawl.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. gentryi</i> B. Ullrich	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. bookeri</i> Jacobi	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. horrida</i> Lem. ex Jacobi	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. inaequidens</i> K. Koch	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. jaibolí</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. karwinskii</i> Zucc.	García Valenzuela, 2011; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. kerchovi</i> Lem.	García Valenzuela, 2011; Brena Bustamante, 2012; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. lechuguilla</i> Torr.	McLaughlin y Schuck, 1991; Parra Negrete <i>et al.</i> , 2010; Colunga-GarcíaMarín <i>et al.</i> , 2015
<i>A. lophanta</i> Schiede	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010
<i>A. macroantha</i> Zucc.	García Valenzuela, 2011; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. mapisaga</i> Trel.	Parra Negrete <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. marmoratha</i> Roezl	García Valenzuela, 2011; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. mitis</i> Mart.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. montana</i> Villarreal	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. moranii</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. multiflora</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. murpheyi</i> Gibson	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. ocabui</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. ornitobroma</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. ovatifolia</i> Starr & Villarreal	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. palmeri</i> Engelm.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>Ag. parrasana</i> A. Berger	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. parryi</i> Engelm.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. peacockii</i> Croucher	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023

Anatomía, composición química y genómica de las fibras de *Agave* spp.

<i>A. pelona</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. quitopecensis</i> García-Mend. & S. Franco	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. rhodacantha</i> Trel.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. salmiana</i> Otto ex Salm-Dyck	Parra Negrete <i>et al.</i> , 2010; Reyes Samila, 2016
<i>A. scabra</i> Salm-Dyck	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010.
<i>A. schidigera</i> Lem.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. striata</i> Zucc.	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. sisalana</i> Perr.	De Barros Salgado, 1979; Colunga-GarcíaMarín <i>et al.</i> , 2015
<i>A. tequilana</i> F.A.C. Weber	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. triangularis</i> Jacobi	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. univittata</i> Haw.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. victoria-reginae</i> T. Moore	Salcedo-Martínez <i>et al.</i> , 2010; Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. vilmoriniana</i> A. Berger	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. vivipara</i> L.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. weberi</i> J. F. Cels ex J. Poiss.	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. wocomabi</i> Gentry	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023
<i>A. xylonacantha</i> Salm-Dyck	Alducin-Martínez <i>et al.</i> , 2023

Anatomía y composición química de las fibras de agaves

En los agaves, las fibras están dispersas como paquetes dentro del tejido parenquimatoso de la hoja; su longitud y diámetro pueden variar dependiendo de la especie, estado de desarrollo o condiciones de crecimiento. En *A. sisalana* una hoja presenta aproximadamente 700 a 1400 paquetes de fibras; la longitud de la fibra oscila de 0.5 a 1.5 metros, con un diámetro promedio de 200 μm (de Andrade Silva *et al.*, 2008). En *A. lechuguilla* la fibra es corta, hasta de 40 cm y un diámetro de 333-450 μm (Belmares *et al.*, 1979; Castillo Quiroz *et al.*, 2013). En *A. americana* son aún más cortas, entre 11 y 12 cm

de longitud, y un diámetro promedio de 204 μm . En *A. tequilana* la longitud de la fibra es similar a aquellas de *A. salmiana*; van desde 1 a 12 cm, pero con un diámetro mayor que oscila entre 537-584 μm (Binoj & Binin, 2019).

A nivel anatómico, cada fibra está integrada por numerosas células individuales alargadas, unidas por medio de laminillas medias, que consisten principalmente de pectinas. En *A. sisalana* estas células pueden medir de 6-30 μm y presentan pared primaria, pared secundaria, pared terciaria y lumen. En la pared primaria las fibrillas tienen una estructura reticulada, mientras que en la pared secundaria externa las fibrillas están dispuestas en espirales. La pared terciaria delgada más interna tiene una estructura fibrilar paralela y encierra al lumen (de Andrade Silva *et al.*, 2008). Las fibras pueden también rodear total o parcialmente a los haces vasculares; en este caso, la unidad de fibra está integrada por las células arriba descritas, típicamente células de esclerénquimas, más xilema y floema (Hulle *et al.*, 2015).

Unos de los primeros trabajos para conocer los tipos de fibras y sus patrones de distribución dentro de la hoja se hicieron en lechuguilla y sisal (Bell & King, 1944; Bisanda & Ansell, 1992). En sisal se han reportado tres tipos básicos de fibras: estructurales o mecánicas, de cinta y de xilema. Las primeras se hallan en la periferia de la hoja y le dan rigidez a ella. Las fibras del arco o de cinta crecen en asociación con los tejidos conductores de la planta y generalmente se encuentran en la parte central de la hoja. El tercer tipo de fibras que describen Bisanda y Ansell (fibras de xilema) son, de hecho, fibras que se pueden hallar en el centro de la hoja, por tanto, se pueden reclasificar como fibras de cinta. La figura 2 muestra micrografías de microscopio electrónico de barrido de fibras de *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. salmiana* (Figura 2A-D). Se ilustra también una fibra típica de cinta rodeando al xilema y al floema en *A. tequilana* (Figura 2E).

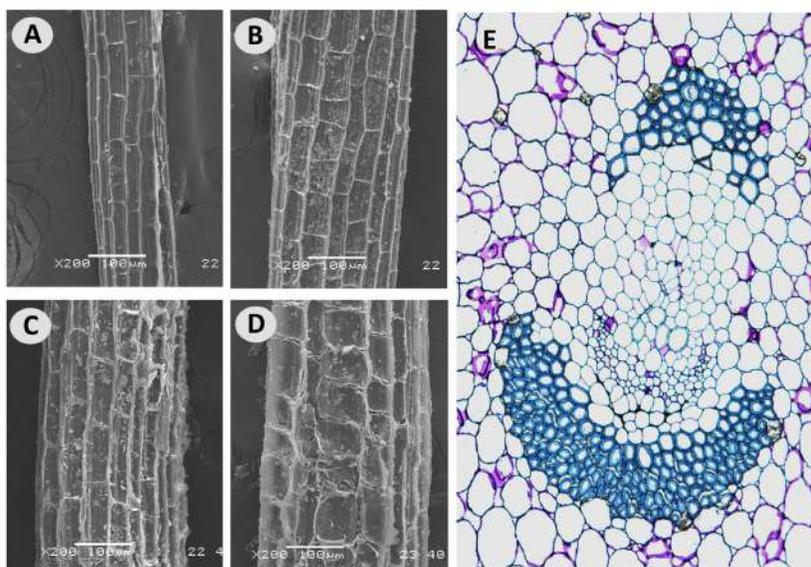


Figura 2. Fibras de agaves. Micrografías de MEB de **A)** *A. tequilana*, **B)** *A. angustifolia*, **C)** *A. salmiana* var. amarillo, **D)** *A. salmiana* var. manso. E) Fibra de cinta de *A. tequilana* teñida con azul de toluidina al 0.1%.

Las fibras de agave están compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Las fibras también contienen ceras y pectinas, que muy pocas veces se cuantifican y, por lo tanto, su papel en las propiedades tenso-mecánicas de la fibra es poco entendido. La composición química de la fibra depende de varios factores, como la especie de agave, condiciones climáticas y de suelo, edad de la planta, entre otros. La Tabla 2 muestra la composición química de fibras de algunas especies e híbridos de agaves que han sido aprovechadas para la obtención de fibras. No existen estudios que detallen la composición en función del tipo de fibra (estructurales y de cinta), así que los valores hallados incluyen ambas categorías. Los niveles reportados para cada uno de los componentes es especie dependiente y también pueden variar en función de la técnica de extracción y procesamiento de la fibra (mecánica o química). De la Tabla 2 resaltan los altos contenidos de celulosa para henequén y lechuguilla (cercamos al 80 %), que contrastan con aquellos de los agaves pulqueros *A. atrovirens* y

A. salmiana (menor a 36 %). Un rasgo de interés para la industria del bioetanol son los bajos porcentajes de lignina; en algunas especies como *A. atrovirens* y *A. americana* entre 2-4.85 %.

Tabla 2. Composición química de fibras de agave (% del peso total seco)

Especie/ Híbrido	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Ceras	Referencias
<i>A. americana</i>	68.42	15.67	4.85	0.26	Mylsamy y Rajendran 2010
<i>A. angustifolia</i>	48.04	34.08	20.69	NR	Hidalgo-Reyes <i>et al.</i> , 2015
<i>A. atrovirens</i>	24-36	10	2	NR	Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2017
<i>A. cantala</i>	48.97	34.41	11.41	NR	Yudhanto <i>et al.</i> , 2021
<i>A. fourcroydes</i>	77.6	5-7	13.1	NR	Escamilla-Treviño, 2012
<i>A. lechuguilla</i>	79.8	3-6	15.3	NR	Vieira <i>et al.</i> , 2002
<i>A. salmiana</i>	32	11	10	NR	Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2017
<i>A. sisalana</i>	71	11.7	8.7	NR	Sahu y Gupta, 2017
<i>A. tequilana</i>	62.41	18.28	11.57	0.19	Binoj y Binin, 2019
H11648	60.20	16.03	15.20	NR	Magaton, 2015

NR = No reportado.

Dentro de la fracción de hemicelulosa, los componentes más abundantes son xilosa, galactosa y ácido galacturónico (**Figura 3**). En *A. lechuguilla* el contenido de xilosa es casi el doble que el hallado en *A. salmiana* var. manso y amarillo; sin embargo, las fibras de estas variedades contienen cantidades significativamente mayores de arabinosa, galactosa, manosa y ácido galacturónico, que explican posible mayor suavidad de la fibra comparada con aquellas de lechuguilla.

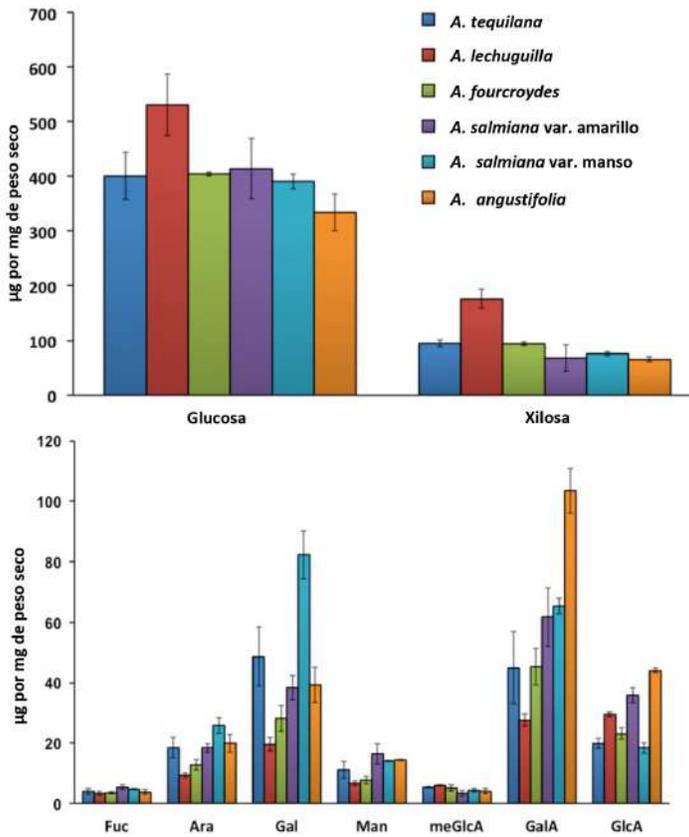


Figura 3. Carbohidratos estructurales de fibra de agave. Se muestra la composición obtenida por HPAEC-PAD de celulosa (como monómeros de glucosa) y principales componentes de la fracción de hemicelulosa. Fuc = fucosa; Ara = arabinosa; Gal = galactosa; Man = manosa; meGlcA = ácido 4-O-metil glucurónico; GalA = ácido galacturónico; GlcA = ácido glucurónico.

Identificación de genes involucrados en la biosíntesis de componentes de fibras y su posible uso como marcadores de selección

Ante la ausencia de reportes de genomas secuenciados de especies de agaves, la identificación y análisis de genes involucrados en la biosíntesis y metabolismo de pared celular de fibras se han realizado usando enfoques de RNAseq. Las especies secuenciadas han sido *A. tequilana*, *A. sisalana*, *A. fourcroydes* y el híbrido H11648, de los cuales se han obtenido perfiles transcripcionales de distintos órganos como raíz, piña, meristemos y hojas, a diferentes edades (Gross *et al.*, 2013; Ávila de Dios *et al.*, 2015; Ávila de Dios, 2019; Sarwar *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Raya *et al.*, 2021; Maceda-López *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2022).

Considerando la composición química de una fibra, los análisis bioinformáticos se han enfocado en las rutas de biosíntesis de celulosa y lignina. En *A. tequilana* se han identificado al menos 6 seis genes ortólogos codificantes para la enzima celulosa sintasa (CESA), clave en la producción de celulosa (Maceda-López *et al.*, 2022); en contraste, solo 3 tres ortólogos CESA se pudieron identificar en *A. sisalana*, *A. fourcroydes* y H11648 (Raya *et al.*, 2021). Sin embargo, ambos estudios coinciden en indicar el alto nivel de expresión del ortólogo para CESA7 tanto en *A. tequilana* como *A. fourcroydes*, un gen conocido por su rol en la biosíntesis de pared secundaria. En *A. tequilana*, AtqCESA7 está altamente expresado en tejido adyacente a la fibra, sugiriendo tener una función importante en el desarrollo de la misma (Maceda-López *et al.*, 2022). En *A. fourcroydes*, el ortólogo para CESA4 presenta un nivel de expresión directamente proporcional con el contenido de celulosa durante el desarrollo de la hoja (García-Castillo *et al.*, 2022).

En el caso de genes involucrados en la formación de lignina, los análisis filogenéticos señalan que AtqCAD5 es probablemente la enzima *bona fide* para la biosíntesis de este compuesto en *A. tequilana*; esta idea es apoyada por una mayor expresión del gen en tejido cercano a la fibra en comparación con lo hallado en tejido parenquimatoso

(Maceda-López *et al.*, 2022); de manera similar, CAD5 muestra un nivel de expresión alto y moderado en *A. angustifolia* y en el híbrido H11648, respectivamente (Huang *et al.*, 2022). Estos resultados sugieren que es posible usar la cuantificación de los niveles de expresión de los genes CESA y CAD como un componente en los enfoques de mejoramiento genético asistido por marcadores para mejorar la calidad de fibra en agaves.

Conclusiones

Existen avances en el conocimiento de la composición química y propiedades tenso-mecánicas de las fibras de agaves. No obstante, el conocimiento actual se restringe a pocas especies; nuestra revisión de literatura encontró hasta 66 especies que son aprovechadas como fuentes de fibras; estas especies son un germoplasma sumamente valioso para el mejoramiento genético con fines de calidad de la fibra. La disponibilidad de genomas de referencia de alguna especie del género facilitará no solo el entendimiento de los procesos moleculares que controlan la formación y composición de la fibra, sino también el uso y validación de genes biosintéticos de pared celular como posibles marcadores de selección genética.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado el proyecto Conacyt Fronteras de la Ciencia 2015-2 1049. Se agradece a Silvia Andrade Canto (CICY) por la toma de las fotos de MEB, y al Dr. José Luis Villalpando Aguilar (Unidad Académica Yucatán, UNAM), Biol. Brandon Vera Valgañón y M. C. Luis Carlos Gutiérrez Pacheco (UBBMP, CICY) y Dra. Laura Trejo Hernández (LRByCTV, UNAM) por su apoyo en el trabajo de campo.

Referencias

Alducín-Martínez, C., Ruiz Mondragón, K. Y., Jiménez-Barrón, O.,

- Aguirre-Planter, E., Gasca-Pineda, J., Eguiarte, L. E., & Medellín, R. A. (2023). Uses, knowledge and extinction risk faced by Agave Species in Mexico. *Plants*, 12, 124. doi.org/10.3390/plants12010124.
- Ávila de Dios, E., Gómez Vargas, A. D., Damián Santos, M.L., & Simpson, J. (2015). New insights into plant glycoside hydrolase family 32 in agave species. *Frontiers in Plant Science*, 6, 594. doi.org/10.3389/fpls.2015.00594.
- Ávila de Dios, E.A, Delaye, L., & Simpson, J. (2019). Transcriptome analysis of bolting in *A. tequilana* reveals roles for florigen, MADS, fructans and gibberellins. *BMC Genomics*, 20, 473. doi.org/10.1186/s12864-019-5808-9.
- Bell, W.H y King, C.J. (1944). Methods for the identification of the leaf fibers of mescal (Agave), yucca (Yucca), beargrass (Nolina) and sotol (Dasylirion). *Am. Antiq.*, 10,: 150–160. Doi:10.2307/275111.
- Bell, W. H. & King, C. J. (1944). Methods for the identification of the leaf fibers of mescal (Agave), yucca (Yucca), beargrass (Nolina) and sotol (Dasylirion). *American Antiquity*, 10, 150–160. Doi:10.2307/275111.
- Belmares, H., Castillo, J.E., Barrera, A. (1979). Natural hard fibers of the North American continent. Statistical correlations of physical and mechanical properties of lechuguilla (*Agave lechuguilla*) fibers. *Textile Research Journal*, 49, 619–622. doi.org/10.1177/004051757904901101.
- Binoj, J. S. & Bibin, J. S. (2019). Failure analysis of discarded *Agave tequilana* fiber polymer composites. *Engineering Failure Analysis*, 95, 379-391. Doi: 10.1016/j.engfailanal.2018.09.019 10.1016/j.engfailanal.2018.09.019
- Bisanda, E.T.N & Ansell, M.P. (1992). Properties of sisal-CNSL composites. *Journal of Materials Science*, 27, 1690-1700. doi.org/10.1007/BF00542934.
- Brena Bustamante, P. (2012). *El aprovechamiento y la estructura poblacional de Agave kerchovei Lem., en Tehuacán-Cuicatlán, México* [tesis tesis de postgrado, Colegio de Postgraduados]. Repositorio COLPOS.

<http://hdl.handle.net/10521/715>.

- Castillo Quiroz, D., Sáenz Reyes, J. T., Narcia Velasco, M., & Vázquez Ramos, J. A. (2013). Propiedades físico-mecánicas de la fibra de *Agave lechuguilla* Torr. de cinco procedencias bajo plantaciones. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 4(19), 78-91. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322013000500007&lng=es&tlng=es.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D., & Martínez Torres, J. (2007). Tradiciones en el aprovechamiento de los *Agaves* mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. En P. Columnga-GarcíaMarín, *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves* (pp. 229-248). CICY.
- De Andrade Silva, F., Chawla, N. & de Toledo, F.R.D. (2008). Tensile behavior of high performance natural (sisal) fibers. *Composites Science and Technology*, 68, 3438-3443. doi.org/10.1016/j.compscitech.2008.10.001.
- de Barros Salgado, A.L & Dirceu Ciaramello, A. A. (1979). Mejoramiento de agave por hibridación sisal breeding. *Bragantia*, 38, 3710-3717.
- Díaz, M., Yépez, L., & Gotopo, E. (2018). *Agave cocui*: un noble de las zonas áridas de Venezuela. *Desde el Herbario CICY*, 10, 137-143.
- Escamilla-Treviño, L.L. (2012). Potential of plants from the genus *Agave* as bioenergy crops. *Bioenergy Research*, 5, 1-9. doi.org/10.1007/s12155-011-9159-x.
- García Valenzuela, M. A. (2011). *Etnoecología de los Agaves (Agavaceae) en la comunidad Ngüva (Popoloca) de los Reyes Metzontla, Puebla, México* [tesis de maestría, Colegio de Postgraduados]. Repositorio institucional COLPOS. <http://hdl.handle.net/10521/440>
- García-Castillo, M., Rodríguez-Zapata, L., & Sanchez Teyer, L. (2022). Differential expression of *CesA* genes and the relationship with fiber content in henequen. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(3). doi:<http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.4328>
- Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juarez, M. J., Wang, Z., & Visel, A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC*

- Genomics*, 14, 563. doi.org/10.1186/1471-2164-14-563.
- Hidalgo-Reyes, M., Caballero-Caballero, M., Hernández-Gómez, L. H., & Urriolagoitia-Calderón, G. (2015). Chemical and morphological characterization of *Agave angustifolia* bagasse fibers. *Botanical Sciences*, 93(4), 807-817. <https://doi.org/10.17129/botsci.250>
- Huang, X., Xiao, M., Xi, J., He, C., Zheng, J., Chen, H., Gao, J., Zhang, S., Wu, W., Liang, Y., Xie, L., & Yi, K. (2019). De Novo Transcriptome Assembly of *Agave* H11648 by Illumina Sequencing and Identification of Cellulose Synthase Genes in *Agave* Species. *Genes*, 10(2), 103. <https://doi.org/10.3390/genes10020103>
- Huang, X., Xu, B., Tan, S., Huang, Y., Xi, J., Qin, X., Chen, T., Chen, H., Yang, X., & Yi, K. (2022). Transcriptome Sequencing of *Agave angustifolia* Reveals Conservation and Diversification in the Expression of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Genes in *Agave* Species. *Agriculture*, 12(7), 1003. <https://doi.org/10.3390/agriculture12071003>
- Hulle, A., Kadole, P., & Katkar, P. (2015). *Agave Americana* Leaf Fibers. *Fibers*, 3(4), 64–75. <https://doi.org/10.3390/fib3010064>
- Kozen, F. H & Netravali, A. N. (2014). Cellulosic fibers: A brief review. En A. N. Netrabali N. & C. M. Pastore (eds.), *Sustainable Composites* (pp. 143-180). DEStech Publications, Inc.
- Maceda-López, L. F., Góngora-Castillo, E. B., Ibarra-Laclette, E., Morán-Velázquez, D. C., Girón Ramírez, A., Bourdon, M., Villalpando-Aguilar, J. L., Toomer, G., Tang, J. Z., Azadi, P., Santamaría, J. M., López-Rosas, I., López, M. G., Simpson, J., & Alatorre-Cobos, F. (2022). Transcriptome Mining Provides Insights into Cell Wall Metabolism and Fiber Lignification in *Agave tequilana* Weber. *Plants*, 11(11), 1496. <https://doi.org/10.3390/plants11111496>
- Magaton, A.S., Mascena da Cunha, C., de Almeida Peixoto, M.Q., & dos Santos Conceicao, S. (2015, 26 de mayo). *Hemicelluloses extraction from Agave sisalana and Hybrid 11648*. [Ponencia]. 7th International Colloquium on Eucalyptus Pulp. Vitoria, Espirito Santo, Brazil. https://www.eucalyptus.com.br/artigos/4_Andreia+Magaton.pdf
- McLaughlin, S.P., & Schuck, S.M. (1991). Fiber properties of several

- species of Agavaceae from the Southwestern United States and Northern Mexico. *Economic Botany*, 45, 480–486. Doi:10.1007/bf02930710.
- Mylsamy, K., & Rajendran, I. (2010). Investigation on physio-chemical and mechanical properties of raw and alkali-treated *Agave americana* fiber. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 29 (19), 2925–2935. doi:10.1177/0731684410362817
- Nobel, P. S. (1998). *Los incomparables Agaves y cactus*. Editorial Trillas.
- Parra Negrete, L. A, Villar Quiñones, P., & Prieto Rodríguez, A. (2010). Extracción de fibras de *Agave* para elaborar papel y artesanías. *Acta Universitaria*, 20, 3, 77-83 <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/2055>.
- Pérez-Pimienta, J.A, López-Ortega, M.G, & Sanchez, A. (2017). Recent developments in *Agave* performance as a drought-tolerant biofuel feedstock: agronomics, characterization, and biorefining. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 11, 732– 748 doi.org/10.1002/bbb.1776.
- Raya, F. T., Marone, M. P., Carvalho, L. M., Rabelo, S. C., De Paula, M. S., Zaneli Campanari, M. F., Freschi, L., Sampaio Mayer, J. L., Ferrerira Silva, O. R. R., Mieczkowski, P., Falsarella Carazzolle, M., & Guimaraes Pereira, G. A. (2021). Extreme physiology: Biomass and transcriptional profiling of three abandoned *Agave* cultivars. *Industrial Crops and Products*, 172, 114043. doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114043.
- Reyes Samilpa, A. (2016). *Análisis etnobotánico y caracterización física de las fibras de Agave salmiana y A. mapisaga en la región de Ixmiquilpan, Hidalgo* [tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio institucional UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/4671>
- Robert, M. L., Lim, K. Y., Hanson, L., Sanchez-Teyer, F., Bennett, M. D., Leitch, A. R., & Leitch, I. J. (2008). Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158 (2), 215–222. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00831.x>

- Sahu, P., & Sisal, G.M. (2017). (*Agave sisalana*) fibre and its polymer-based composites: A review on current developments. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 36 (24), 1759-1780. doi:10.1177/0731684417725584
- Salcedo-Martínez, S. M., González-Álvarez, M., & Moreno-Limón, S. (2010). Plantas productoras de fibras de importancia económica. En M. Alvarado Vázquez, A. Rocha Estrada, & S. Moreno Limón (eds.), *De la lechuguilla a las biopelículas vegetales* (pp. 199-226). UANL.
- Sarwar, M. B., Ahmad, Z., Rashid, B., Hassan, S., Gregersen, P. L., De la O Leyva, M., Nagy, I., Asp, T., & Husnain, T. (2019). De novo assembly of *Agave sisalana* transcriptome in response to drought stress provides insight into the tolerance mechanisms. *Scientific Reports*, 9, 396. doi.org/10.1038/s41598-018-35891-6.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). *Actualización de la superficie de henequén en el estado de Yucatán. Publicación 16*. SADER. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/451423/Publicaci_n_16_-_Utilidad_de_la_Frontera_Agricola_en_el_estado_de_Yucat_n.pdf
- Vieira, M. C., Heinze, T., Antonio-Cruz, R., & Mendoza-Martínez, A. M. (2002). Cellulose derivatives from cellulosic material isolated from *Agave lechuguilla* and fourcroydes. *Cellulose*, 9, 203–212. doi.org/10.1023/A:1020158128506.
- Yudhanto, F., Jamasri, J., Rochardjo, H., & Kusumaatmaja, A. (2021). Experimental Study of Polyvinyl Alcohol Nanocomposite Film Reinforced by Cellulose Nanofibers from Agave Cantala. *International Journal of Engineering*, 34(4), 987-998. doi: 10.5829/ije.2021.34.04a.25
- Zuleta, M. C., & Orensanz, L. (2004). Hacienda Pública y exportación henequenera en Yucatán, 1880-1910. *Historia Mexicana*, 54(1), 179–247. <http://www.jstor.org/stable/25139555>

1.6 *Sycphophorus acupunctatus* GYLLENHAL PLAGA DE LOS MAGUEYES EN MÉXICO

Héctor González Hernández¹

RESUMEN

El picudo del agave *Sycphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Dryophthoridae) es la principal plaga de las agaváceas cultivadas como el tequilero, mezcaleros, pulqueros, henequén, sisal o nardo; además de atacar agaváceas silvestres de los desiertos o áreas naturales de casi todo el país. El picudo del agave es de origen del norte de México y sur de Estados Unidos de América, aunque actualmente es de distribución cosmopolita, con amplia distribución en países de Centro América, algunos de Sudamérica, con reportes en varios países de Europa, Oriente Medio, África y Oceanía, donde han llevado ejemplares con fines de ornato o para la producción de fibras. Una de las tácticas más sugeridas para el control de esta plaga, aunque correctiva, es el control cultural mediante la remoción de plantas infestadas que, de acuerdo con la madurez de estas, puede ser por eliminación, jima fitosanitaria o de recuperación. Para el caso de plantaciones de agave pulquero, el control cultural debe incluir la limpieza y eliminación de restos de pencas en el proceso de raspado para evitar focos de infestación. Como parte de la comunicación química de este grupo de picudos, los adultos emiten compuestos feromonales de agregación, donde los machos al llegar a una planta llaman mediante estos compuestos a más individuos de ambos sexos de su población para comenzar el proceso de colonización y con más individuos poder doblegar las defensas de la planta más fácil y rápidamente. Este comportamiento se ha aprovechado para desarrollar sistemas

¹ Colegio de Postgraduados, Posgrado en Fitosanidad, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. hgzzhdz@colpos.mx

de monitoreo, sintetizando los compuestos feromonales responsables de esta comunicación y usarlos para programa de trapeo para el monitoreo o para trapeo masivo con fines de control. De esta forma, para esta plaga ya se cuenta con un diseño de trampa que es efectiva para determinar el comportamiento estacional y establecer períodos críticos para iniciar acciones de manejo como el químico, cultural o biológico. A nivel de plantaciones comerciales de agave, se han aplicado productos de origen natural como distintas cepas de hongos o nematodos entomopatógenos. Además, en forma natural, se presentan otros agentes de control del picudo del agave, como parasitoides y escarabajos depredadores, que pueden tener un papel importante en la regulación de este picudo.

Introducción

Importancia económica de los agaves en México

Tequila

En México, la superficie sembrada de agaves ha tenido un incremento sostenido en la superficie sembrada entre el 2017 y el 2021, al pasar de 105,786 ha a 139,314 ha. Estos datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2023) se refieren a las distintas especies de agave cultivados como el mezcalero, pulquero y tequilero. De estas superficies sembradas y que está relacionado con las edades de las plantaciones, solo se llega a cosechar (jimar) alrededor del 17 al 20%. También se ha tenido un crecimiento sostenido en los volúmenes de producción de la materia prima con 1.7 millones de toneladas en 2017 a 1.9 millones de toneladas en 2020 (SIAP, 2023).

En la industria tequilera, estos incrementos en la producción de materia prima se ven reflejados en aumentos en los volúmenes de producción de litros totales procesados por esta industria. De acuerdo con el Consejo Regulador Del Tequila [CRT] (2023), en 2017 la producción total de esta bebida fue de 171.4 millones de litros; mientras que en 2022 fue de 651.4 millones de litros, lo que habla de la creciente demanda de este producto en los mercados internacionales.

El tequila es uno de los principales productos de exportación del país. En 2017 se exportaron 213.3 millones de litros (alcohol 40%) y en 2022, 418.9 millones de litros (CRT, 2023). Estados Unidos de América es uno de los principales destinos de esta bebida, a donde en 2022 se exportaron 338.4 millones de litros, el 80.8% del volumen exportado en ese año. Otros países con alta demanda son Alemania, España, Francia, Reino Unido, Canadá, Colombia, Italia, Australia, Japón, Países Bajos, con volúmenes de 2.0 a 10.3 millones de litros exportados (CRT, 2023).

Mezcal

En 2021 la superficie destinada a la producción de mezcal fue de 19,675 ha, con una producción de 371,228 ton, cultivo en el que Oaxaca es el principal productor con una superficie de 8,101 h (SIAP, 2023). De acuerdo con el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, A.C. (COMERCAM), en 2018 la producción nacional de esta bebida fue de 5.09 millones de litros (alcohol 45%) (CRM, 2022). Cerca del 50% de la producción de mezcal se exporta a países como EUA, España, Francia, Reino Unido, Países Bajos. En 2018 el volumen de mezcal exportado fue de 3.4 millones de litros, el 67.7 % de la producción de ese año (CRM, 2018).

Plagas y enfermedades de los agaves

De las plagas de los agaves cultivados, el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* (Gyllenhal) (Coleoptera: Dryophthoridae) es considerada la más importante por los daños que causa y su amplia distribución a nivel internacional (Halffter, 1957; Waring & Smith, 1986; Solís-Aguilar *et al.*, 2001; EPPO, 2006; Figueroa-Castro *et al.*, 2013; Cuervo-Parra *et al.*, 2019). Otras plagas importantes que se han registrado atacando a agaves incluyen a varias especies de lepidópteros como los gusanos blancos del maguey *Aegiale hesperiaris* (Walker) (Hesperiidae), *Synpalamides* aff. *escalantei* Hopffer (Castniidae) y el barrenador de pencas *Agathymus rethon* Dyar (Hesperiidae); coleópteros como el cerambícido

del maguey *Acanthoderes funeraria* Bates, el rondón *Stategus aloens* (L.) (Melolonthidae), gallinas ciegas *Phyllophaga* spp. y *Cyclocephala* spp. (Melolonthidae); insectos escama como la escama armada *Acutaspis agavis* (Twsend y Cock.) (Hemiptera: Diaspididae) y el piojo harinoso *Pseudococcus variabilis* (Von Ellenrieder & Wtason) (Hemiptera: Pseudococcidae) (Halfpeter, 1957; Solís-Aguilar *et al.*, 2001; González-Hernández *et al.*, 2007; Lugo-García *et al.*, 2009; Olivares-Orozco *et al.*, 2017). Por otro lado, entre las principales enfermedades del agave está la marchitez del agave, causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtendal, la pudrición del cogollo *Pectobacterium carotovora* (Jones) y la mancha gris o tizón foliar *Cercospora agavicola* (Ayala-Escobar *et al.*, 2005; Rubio-Cortés, 2007; Virgen-Calleros, 2011; Coria-Contreras *et al.*, 2019; Aquino-Bolaños *et al.*, 2020).

El picudo del agave en México

Importancia económica y tipos de daño

En cultivos de agave tequilero (*Agave tequilana* var. azul Weber, Asparagaceae) de Jalisco y mezcalero de Oaxaca se han registrado daños importantes por *S. acupunctatus* en la materia prima –cabezas o piñas (mezontle o tallo)– que llega a las fábricas procesadoras, ya que las larvas barrenan esta parte de la planta, pudiendo inclusive consumir del 25% de las mitades de piñas de agave tequilero (piñas que antes de pasar a cocimiento y molienda son partidas a la mitad) (Solís-Aguilar *et al.*, 2001) y de un 10.3% en agave espadín (mezcalero, *Agave angustifolia* Haw.) (Aquino Bolaños *et al.*, 2007) y hasta el 90 o 100% del tejido vegetal, aunado a que estos daños se pueden asociar con hongos o bacterias fitopatógenas que pueden acelerar la muerte o descomposición de toda la planta (Waring & Smith, 1986; Solís-Aguilar *et al.*, 2001; Rodríguez-Garay, 1999; Aquino-Bolaños *et al.*, 2020).

La incidencia del picudo en los agaves cultivados es durante todo el año (Figueroa-Castro *et al.*, 2013). En agaves silvestres, como *Agave palmeri* Engelm., el picudo generalmente ataca la planta poco después de producir el escapo floral o quiote, casi al final de su ciclo de

vida; mientras que en agave cultivados como el *Agave americana* var. *expansa* (Jacobi) Gentry las plantas pueden ser atacadas en cualquier fase de crecimiento o desarrollo. En ambos casos, las larvas de *S. acupunctatus* están frecuentemente presentes en plantas con pudriciones, ya que sus microbios asociados (hongos y bacterias) son los que inducen las pudriciones en esas plantas (Waring & Smith, 1986). Mientras que, en agave tequilero, puede atacar desde el estado de hijuelos hasta plantas maduras casi para jimar (González-Hernández *et al.*, 2007; Figueroa-Castro *et al.*, 2013).

Distribución y hospedantes

El picudo prefiere atacar especies de *Agave*, aunque puede atacar otros géneros de Asparagaceae como palma del desierto *Yucca*, *Dasylirom*, *Dracaena*, *Fucreae* y *Polinathes*. Se tienen reportes de *S. acupunctatus* en *Agave furcroydes* Lem. (henequén), *A. atrovirens* Karw., *A. salmiana* Otto ex. Salm-Dyck (magueyes pulqueros), *A. tequilana* Weber (agave tequilero), *A. angustifolia* Haw. (maguey espadín), *A. cupreata* Trel. & Berger (maguey papalote), *Agave potatorum* (Zucc.) (maguey tobalá) (magueyes mezcaleros), *A. sisalana* Perrine (sisal), *A. americana*, *A. attenuata*, *A. cubensis*, *A. ferdinandiregis*, *A. lechuguilla*, *A. mexicana* y en *A. shawii* (Haffter, 1957; Vauri, 1971; Woodruff & Pierce, 1973; Camino-Lavin *et al.*, 2002; Aquino-Bolaños *et al.*, 2020; Arista-Carmona 2022; Cuevas-López, 2022).

El picudo del agave es de origen americano y de distribución cosmopolita, a donde se han llevado a las diferentes especies de agave. En México, prácticamente donde hay agaves se ha reportado a *S. acupunctatus* (Haffter, 1957; Vauri, 1971; Ramírez, 1993a). De acuerdo con EPPO (2006), se ha detectado en Holanda e Italia, donde las plantas infestadas importadas se destruyeron, por lo que no está presente en esos países de Europa, aunque en España (Guerrero *et al.*, 2021) y el Archipiélago de Madeira, Portugal, existe un reporte reciente (Matos Andrade, 2022). Existen registros en Indonesia y Arabia Saudita en Asia; además de México en Norteamérica, también se ha detectado en Estados Unidos; en Centro América y el Caribe en las Islas Cai-

mán, Costra Rica, Cuba, Antillas Holandesas, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, Nicaragua, Islas Vírgenes y en Oceanía, en Australia (Vauri, 1971; Boot *et al.*, 1990; O'Brian & Wibmer, 1992; EPPO, 2006).

Descripción y biología de *S. acupunctatus*

Los picudos adultos llegan a medir de 10 hasta 19 mm, de color negro brillante (Figura 1); funículo de la antena con seis segmentos. Los adultos se pueden sexar al revisar el último segmento abdominal, en las hembras es agudo, mientras que en los machos es romo en forma de media luna (Figura 1) (Ramírez, 1993a). Los huevos son ovoides de color blanco-cremoso, de aproximadamente 0.5 mm de ancho por 1.5 mm de largo (Look, 1969). La larva es apoda, de color amarillo y cabeza grande, margen posterior del 9º segmento con un par de proyecciones (más largos que anchos), cada una con tres setas largas. Las pupas son exaratas y llegan a medir 16 mm de largo (Woodroff & Pierce, 1973).



Figura 1. Adulto de *Sycphophorus acupunctatus* en vista lateral y últimos segmentos abdominales de hembra y machos

Las hembras de *S. acupunctatus* comúnmente ovipositan en la base de las hojas del cogollo, a una altura media de estas o dentro de las cabezas barrenadas, en donde siguen viviendo los adultos, ya que la

pupación ocurre dentro de las cabezas o mezontle y construyen el cocón con fibra de la cabeza del agave (González-Hernández *et al.*, 2007). Cada hembra ovíparos de 25 a 50 huevos durante su vida (Lock, 1969; Solís-Aguilar *et al.*, 2001). Las larvas barrenan plantas de cualquier edad, en las de más de cuatro años favorece la entrada de otros insectos o fitopatógenos que aceleran la muerte de la planta; en cambio, en hijuelos el ataque de las larvas no está asociado con enfermedades (Figura 2) (González-Hernández *et al.*, 2007). Solís-Aguilar *et al.* (2001) encontraron una fuerte asociación entre el desarrollo de pudrición bacteriana de cogollo con la incidencia del picudo del agave en agave tequilero de tal forma que, en plantas con mayor avance de la enfermedad, la densidad de picudos de cualquier estado de desarrollo era el más alto.

La duración del ciclo biológico de *S. acpunctatus* está muy relacionado con el tipo de huésped que estén atacando. Por ejemplo, en plantas de henequén el ciclo de huevo a adulto se completa entre los 133 a 137 días (Ramírez, 1993a). La incubación de los huevos es entre 3 y 5 días (Siller, 1985) y las larvas que pasan por 11 estadios larvales requieren de 108 días. De acuerdo con Siller (1985), en agave pulquero la larva pasa por tres estadios y requiere de 58 días para completar su desarrollo. En sisal las larvas del picudo pasan por cinco estadios y para su desarrollo requieren de 21 a 58 días (Lock, 1969). En cría de laboratorio sobre tejido de agave tequilero el ciclo del picudo del agave es de cinco días para huevo, 78 días para larva, 11 días para prepupa, 11 días para pupa y el adulto requiere de cinco días para salir del cocón, con un total de 105 días de huevo a adulto (Beltrán García, 2005) (Figura 3). Los adultos son de hábitos crepusculares, aunque pueden mantenerse dentro de la cabeza del agave para copular, al salir de la planta ambos sexos pueden caminar o volar en búsqueda de nuevas plantas (González-Hernández *et al.*, 2007).



Figura 2. Ataque de *S. acupunctatus* en *A. tequilana*, en hijuelos (a), cogollo (b), cabeza o mezontle (c) y cabeza casi consumida

Este picudo, al igual que otras especies de Dryophthoridae, se comunican a través de feromonas de agregación. Ruiz-Montiel *et al.* (2003) determinaron que los machos liberan compuesto feromonales que atraen a ambos sexos y que fueron identificados como 2-metil-4-heptanona, 2-metil-4-heptanol, 2-metil-4-octanona y 2-metil-4-octanol. Posteriormente, Ruíz-Montiel *et al.* (2008) determinaron que la antena del picudo responde más a los compuestos 2-metil-4-heptanol y al 2-metil-4-octanona; sin embargo, a nivel de campo, la respuesta fue mayor en trampas cebadas con las dos cetonas. También en estudios de laboratorio Ruíz-Montiel *et al.* (2009) determinaron que el picudo del agave libera la feromona en correlación directa con su edad desde el primer mes de vida. El picudo también responde a los volátiles que libera la planta de agave, como lo demostró a nivel de laboratorio Altuzar *et al.* (2007) al detectar, mediante electroantenograma, compuestos como el linalol, 3-careno y α -pineno que provocaron respuesta de adultos de *S. acupunctatus*. Derivado de estos estudios, se desarrolló una trampa cebada con los compuestos sintéticos 2-metil-4-heptanona y 2-metil-4-octanona y tejido vegetal de agave fresco, determinando que la 2-metil-4-octanona capturó el mayor número de picudos, siendo más hembras que machos (Rodríguez-Rebollar *et al.*, 2011).

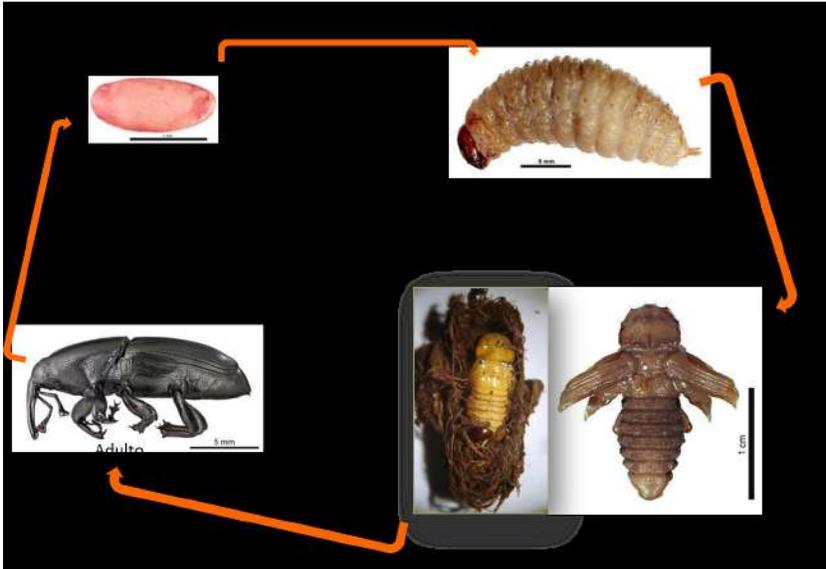


Figura 3. Ciclo biológico general de *Scyphophorus acupunctatus* en varios hospedantes. Imágenes por J. M. Valdez Carrasco.

Actualmente existe un sistema de trapeo para *S. acupunctatus* que incluye la feromona de agregación sintética más tejido de agave, a la cual se agrega un retenedor (insecticida) para evitar la salida de los adultos de las trampas, tanto para plantaciones de agave tequilero (Figuroa-Castro *et al.*, 2013; Figuroa-Castro *et al.*, 2016a; Figuroa-Castro *et al.*, 2016b), como mezcalero (Figuroa-Castro *et al.*, 2017). Con este sistema de trapeo, Figuroa-Castro *et al.* (2013) determinaron que la captura de adultos del picudo del agave en plantaciones comerciales de agave tequilero en Ahualulco y Amatitán, Jalisco, se lleva a cabo todo el año, con picos de capturas en mayo. También encontraron que la densidad de picudos por planta presentó picos poblacionales entre abril y mayo, con una mayor proporción de capturas de hembras que machos. La densidad poblacional de picudo del agave en planta, de acuerdo a Solís-Aguilar *et al.* (2001), presenta picos en abril en Tequila, Jalisco (1999-2000), mientras que, en Tepatitlán, Jalisco, detectó un pico más prolongado de marzo a julio (1999) y otro pico en abril del año siguiente (2000).

En plantas de agave la relación sexual hembras-macho es aproximadamente 1:1 (Figueroa-Castro *et al.*, 2013). De acuerdo con el SENASICA (2018), en los estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas, que tuvieron Campaña Nacional contra Plagas Reglamentadas del Agave, el promedio nacional de picudos por trampa con feromona sexual de agregación-tejido de agave fue, de 2014 a 2017, de 4.9, 1.9, 1.8 y 4.2, respectivamente. En agaves mezcaleros *A. angustifolia* y *A. cupreata*, en Santa Cruz y Quetzalapa, Guerrero, se han detectado picos de capturas de *S. acupunctatus*, con el mismo sistema de trapeo en septiembre y octubre (Cuevas López, 2022). Por otro lado, en plantaciones de agave pulquero *A. salmiana*, en el noreste del Estado de México, la captura de picudos en trampas (mismo sistema que en agave tequilero) tuvo picos de mayo a junio y de octubre a noviembre (Arista Carmona, 2022).

Medidas de control

A finales de la década de 1990 y principios de la década del 2000 se probaron experimentalmente insecticidas de acción de contacto y sistémicos para el control del picudo del agave en plantaciones comerciales de agave tequilero, de los cuales el forato, azinfos metílico, paratión metílico, metomilo, endosulfan, carbofuran y lambda cialothrina resultaron efectivos para el control de este picudo, cabe señalar que la mayoría de estos productos ya están fuera del mercado (Solís Aguilar, 2001; González-Díaz 2002). El paratión metílico también era efectivo para el control del picudo en maguey pulquero de Hidalgo y del Henequén en Yucatán (Pineda, 1983; Ramírez, 1993b). En esos años el picudo del agave era susceptible a casi cualquier insecticida, desde forato (extremadamente tóxico) hasta malatión (moderadamente tóxico) (González-Hernández *et al.*, 2007). En Tamaulipas, en agave tequilero Terán-Vargas *et al.* (2012) evaluaron insecticidas para el control de *S. acupunctatus*, determinando que productos como el malatión, endosulfan, metomilo y fipronil fueron los más eficientes. Recomiendan rotación de productos de diferente modo de acción y combinar esta táctica con atrayentes alimenticios, entomopatógenos

y feromonas de agregación para mejorar las acciones de control de esta plaga.

Respecto a los entomopatógenos, se han evaluado experimentalmente a nivel de laboratorio y campo sobre *S. acupunctatus*, los hongos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Verticillium* sp., con efectividad aceptable de *B. bassiana* (Álvarez Magaña, 2000; Pacheco Sánchez, 2002). Gkounti *et al.* (2015) también obtuvieron alta mortalidad de adultos de *S. acupunctatus* causada por *B. bassiana*. También a nivel de laboratorio se ha evaluado sobre larvas y adultos de *S. acupunctatus* el uso de nematodos entomopatógenos como *Steinernema feltiae* Filipjev (82% de control) (Aquino Bolaños *et al.*, 2006) y *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunaka y David, con mejores porcentajes de mortalidad del 59% por *S. feltiae* (Cervantes-Preciado *et al.*, 2006).

En diversas especies de agaves se han detectado varias especies de insectos entomófagos asociados a *S. acupunctatus*, como la avispa *Alienochypeus insolitus* Shenefelt (Hymenoptera: Braconidae) en *A. tequilana* y en *A. vivipara* L. (= *A. angustifolia* Haw.) y que parasita larvas de último estadio del picudo del agave (Figueroa-Castro *et al.*, 2017). De diferentes especies de *Agave* de Guerrero, Jalisco y Morelos se tienen registros de *Hololepta polita* (Marseul), *H. yucateca* (Marseul) y *H. vicina* LeConte (Coleoptera: Histeridae), que son de los depredadores más importante de larvas de *S. acupunctatus* (Salcedo-Delgado *et al.*, 2018). Finalmente, González-Hernández *et al.* (2007) recomiendan el control cultural o jima fitosanitaria, a través de la eliminación de plantas con pudrición de cogollo en grado 4-5, que tienen una asociación importante con infestaciones de este picudo, aunque puede ser posible la jima recuperación, eliminado solo la parte afectada por el picudo y la pudrición.

Conclusiones

El picudo del agave *S. acupunctatus* es la plaga más importante de agaves silvestres y cultivados, sobre las cuales los adultos y larvas, al empezar a barrenar, se pueden asociar con fitopatógenos que causan pudriciones, lo cual puede provocar la pérdida total de la planta o

en pérdidas importantes en la materia prima para la elaboración de bebidas como el tequila, el mezcal o el pulque. Al ser de hábitos crípticos, las tácticas de control se centran en el control de los adultos. El control cultural mediante la jima fitosanitaria o de recuperación es una alternativa importante y se combina con uso mínimo de insecticidas, permite las aplicaciones de hongos y nematodos entomopatógenos y el control natural por parasitoides y depredadores. El control etológico a través del trapeo masivo puede ser una buena opción y que está en fase de evaluación, tomando en cuenta que en las trampas con feromona de agregación sintética más tejido de agave se captura un alto porcentaje de hembras.

Referencias

- Altuzar, A., Malo, E. A., González-Hernández, H., & Rojas, J. C. (2007). Electrophysiological and Behavioural Responses of *Scyphophorus acupunctatus* (Col. Curculionidae) to *Agave tequilana* var. Blue volátiles. *Journal of Applied Entomology*, 13(2), 121-127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01135.x>
- Álvarez, J.C. (2000). *Patogenicidad comparada de los hongos Verticillium spp., y Beauveria spp., en el picudo del agave Scyphophorus acupunctatus Gyll. (Coleoptera: Curculionidae)* [Tesis de Licenciatura sin publicar, Universidad Autónoma Chapingo].
- Aquino-Bolaños, T., Vega, J. R., & Iparraguirre, C. M. (2006). Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nemátodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *Revista UDO Agrícola*, 6, 92–101.
- Aquino Bolaños, T., Iparraguirre, M. A., & Ruiz, J. (2007). *Scyphophorus acupunctatus* (= *interstitialis*) Gyllenhaal (Coleoptera: Curculionidae). Plaga del agave mezcalero: pérdidas y daños en Oaxaca, México. *Revista UDO Agrícola*, 7, 175–180.
- Aquino-Bolaños, T., Sánchez-García, J. A., Ortiz- Hernández, Y. D., Hernández-Cruz, J., & Cortés-Martínez, C. I. (2020). Carrier and vector of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* and its handling through a base of entomopathogenic fungi in *Agave* sp. *Florida Entomologist*, 103 (2), 243-246.

- Arista Carmona, E. (2022). *Incidencia del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal en cultivares de maguey pulquero en el noreste del estado de México* [Tesis de Maestría sin publicar]. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Ayala-Escobar, V., Yañez-Morales, M. J., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous P. W. (2005). *Cercospora agavicola* – A new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. *Mycotaxon*, 93, 15-121.
- Beltrán-García, M.C. (2005). *El picudo *Scyphophorus acupunctatus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae) y su microbiota asociada al tejido dañado de *Agave tequilana* Weber var. Azul* [Tesis de Maestría no publicada]. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Booth, R. G., Cox, M. L. & Madge, R. B. (1990). *Coleoptera. International Institute of Entomology (An Institute of CAB International)*. Cambridge University Press.
- Camino-Lavin., M., Castrejon-Gómez, V. R., Figueroa-Brito, R., Aldana-Llanos, L., & Valdés-Estrada, M. E. (2002). *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) attacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, México. *Florida Entomologist*, 85, 392-393. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0392:-SACCAP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0392:-SACCAP]2.0.CO;2)
- Cervantes-Preciado, J. F., Molina, J., González-Ramírez, M., Lezama-Gutiérrez, R., Gutiérrez-Bautista, J. M., Herrera-Arredondo, J. C., & Castillo-Pérez, R. A. (2006). Virulencia de nematodos entomopatógenos de las cepas *Steinernema feltiae* cepa California y de *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Steinernematidae, Herterorhabditidae) sobre larvas del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera:Curculionidae). En J. Molina Ochoa, M.A. Mellin Rosas, A.B. Archiva Marroquín y H.C. Arredondo Bernal (eds.). *Memorias XXIX Congreso Nacional de Control Biológico* (pp. 287-291). Soc. Mexicana de Control Biológico, A.C. Manzanillo, Col. 9-10 noviembre.
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. (2022). *Informe estadístico 2022*. Consultado el 30 de abril de 2023. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2022/06/INFORME-2022-_II_-SINTESIS.pdf.

- Coria-Contreras, J. J., Mora-Aguilera, G., Yañez-Morales, M. J., Acevedo-Sánchez, G., Santana-Peñaloza, B., Mendoza-Ramos, C., Jiménez-González, L., Martínez-Bustamante, V. I., García-Martínez, D. C., & Rubio-Cortés, R. (2019). Epidemiología regional aplicada a la caracterización inductiva y pronóstico de la mancha gris del agave azul (*Cercospora agavicola*) en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 71-94.
- Consejo Regulador del Tequila. (s.f.). *Producción y exportaciones*. Consultado el 14 de abril de 2023. <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>.
- Cuervo-Parra, J. A., Pérez-España, V. H., López Pérez, P. A., Morales-Ovando, M. A., Arce-Cervantes, O., Aparicio-Burgos, J. E., & Romero-Cortés, T. (2019). *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae): A weevil threatening the production of agave in Mexico. *Florida Entomologist*, 102(1): 1-9. <https://doi.org/10.1653/024.102.0101>
- Cuevas López, D. (2022). *Manejo del picudo del agave mediante trampeo con feromona y sinergistas en magueyes mezcaleros en Guerrero* [tesis de maestría, Universidad Autónoma de Guerrero]. http://mcagropecuarias.uagro.mx/inicio/images/tesis/18_Tesis-Daniel_Cuevas.pdf
- European Plan Protection Organization. (2006). *Mini data sheet on Scyphophorus acupunctatus*. <https://gd.eppo.int/datasheets/>. Fecha de consulta: 30-abr-2023.
- Figueroa-Castro, P., Solís-Aguilar, J. F., González-Hernández, H., Rubio-Cortés, R., Herrera-Navarro, E. G., Castillo-Márquez, L. E., & Rojas, J. C. (2013). Population dynamics of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) on blue agave. *Florida Entomologist*, 96 (4), 1454-1462.
- Figueroa-Castro, P., López-Martínez, V., Silva García, F., González-Hernández, H. (2017). Food attractants to increase pheromone-baited trap performance for *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae) in mezcal maguey. *Florida Entomologist*, 100(1), 203-205.
- Figueroa-Castro, P., López-Martínez, V., Sánchez-García J. A., & Martínez-Martínez, L. (2017). First record of *Alienoclypeus insolitus*

- Shenefelt, 1978 (Hymenoptera: Braconidae) from Guerrero and distributional data from Jalisco and Oaxaca, Mexico. *Pan-Pacific Entomologist*, 93(4), 234-238. <https://doi.org/10.3956/2017-93.4.234>
- Figueroa-Castro, P., González-Hernández, H., Carrillo-Sánchez, J. L., Solís-Aguilar, J. F., del Real-Laborde, J. I., & Rojas, J. C. (2016a). Effect of the height and distribution pattern of pheromone-baited traps on the capture of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae) on blue agave (Asparagales: Asparagaceae). *Florida Entomologist*, 99 (1), 297-299. <https://www.jstor.org/stable/24722400>
- Figueroa-Castro, P., Rodríguez-Rebollar, H., González-Hernández, H., Solís-Aguilar, J. F., del Real-Laborde, J. I., Carrillo-Sánchez, J. L. & Rojas, J. C. (2016.b). Attraction range and inter-trap distance of pheromone-baited traps for monitoring *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae) on blue agave. *Florida Entomologist*, 99 (1), 94-99.
- Guerreo, F., Jurado-Pardeiro, J., & Ortega, F. (2021). Nuevas citas del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, 1838) en España: ¿continúa su avance hacia el interior peninsular? *Revista Gaditana de Entomología*, 12 (1), 1-10.
- Gkounti, V. T., Markoyiannaki, D., & Kontodimas, D. C. (2015). Pathogenicity of indigenous strains of three entomopathogenic fungi to the sisal weevil, *Scyphophorus acupunctatus* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). *Hellenic Plant Protection Journal*, 8, 46-54. <https://doi.org/10.1515/hppj-2015-0007>
- González-Díaz, J.C., (2002). *Evaluación de Insecticidas para el control del picudo del agave Scyphophorus acupunctatus Gyll., en Tala, Jalisco, México* [Tesis de Licenciatura sin publicar, Universidad Autónoma Chapingo].
- González Hernández, H., Solís Aguilar, J. F., Pacheco Sánchez, C., Flores Mendoza, F. J., Rubio Cortes, R., Rojas, J. C. (2007). Insectos barrenadores del agave tequilero. En H. González-Hernández, J. I., del Real Laborde, J. F., Solís Aguilar (eds.), *Manejo de Plagas del Agave Tequilero* (pp. 39-67). Colegio de Postgraduados and Tequila Sauza S.A. de C.V.

- Halffter, G. (1957). *Plagas que afectan a las distintas especies de Agave cultivadas en México*. Dirección General de Defensa Agrícola, Secretaría de Agricultura y Ganadería.
- Lock, G. W. (1969). *Sisal. Thirty Years Sisal Research in Tanzania. Second Edition*. Tanganyika Sisal Growers Association. Longmans, Green and Coltd.
- Lugo-García, G., Ortega-Arenas, L. D., González-Hernández, H., Aragón-García, A., Romero-Nápoles, J., & Rubio-Cortés, R. (2009). Descripción de las larvas de tercer instar de Melolonthidae (Coleoptera) asociadas al cultivo de *Agave tequilana* var. Azul y su fluctuación Poblacional en Jalisco, México. *Neotropical Entomology*, 38(6), 769-780. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000600010>
- Matos Andrade, M. (2022). The presence of the agave weevil *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, 1838 (Coleoptera: Dryophthoridae) in Madeira Archipelago. A new biological control opportunity or a new invasive species? *Weevil News*, 98, 1-11.
- O'Brien, Ch. W., & Wibmer, G. J. (1982). *Annotated Checklist of the Weevils (Curculionidae Sensu lato) of North America, Central America and the West Indies (Coleoptera: Curculionidae)*. Mem. Amer. Ent. Inst. Number 34. The American Entomological Institute. Ann. Arbor.
- Olivares-Orozco, J., Ramírez-Sánchez, S. E., Jiménez-Aguilar, A., Guerrero-Andrade, O., Montiel-Salero, D., Rodríguez-Diego, J. G. (2017). Notificación de *Acanthoderes funeraria* (Bates) sobre dos tipos de *Agave salmiana* (Otto ex Salm-Dyck) en Hidalgo, México. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 1-5.
- Pacheco Sánchez, C. (2002). *Efectividad biológica de los entomopatógenos Beauveria bassiana (Balls.) Vuill. Y Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sor., sobre el picudo del agave tequilero Scyphophorus acupunctatus Gyll., en Atotonilco, Jalisco* [Tesis de Licenciatura sin publicar, Universidad Autónoma Chapingo].
- Pineda, M. G. (1983). *Control químico de las plagas y enfermedades más comunes del maguey pulquero Agave atrovirens Karw* [Tesis de Licenciatura sin publicar, Universidad Autónoma Chapingo].
- Ramírez, J. L. (1993a). *Max del Henequén Scyphophorus interstitialis Gyll. Bioecología y Control. Serie: Libro técnico*. Centro de Investigación Regional del Sureste. INIFAP-SARH.

- Ramírez, J. L. (1993b). Plagas del Henequén y su control. En H. Barre-ra & R. Díaz (eds.), *Henequén* (pp. 29-37). Centro de Investigación Regional del Sureste. INIFAP. Mérida, Yucatán.
- Rodríguez-Garay, B. (1999). La investigación en agave tequilero en el CIATEJ. En P. Bernache & A. Avalos C. (eds), *El agave*. Unión Agrícola Regional de Mezcal Tequilero en el Estado de Jalisco. Gaceta Informativa. 1: 2-3.
- Rodríguez-Rebollar, H., Rojas, J. C., González-Hernández, H., Ortega-Arenas, L. D., Equihua-Martínez, A., Real-Laborde, J. I., & López-Collado, J. (2012). Evaluación de cebos feromonales para la captura del picudo del agave (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 28(1), 73-85.
- Rubio Cortés, R. (2007). Enfermedades del cultivo de agave. En Rulfo, F. O., Pérez, J. F., del Real, J. I., Byerly, K. F. (eds.). *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de denominación de origen del tequila* (pp. 169-195). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Ruiz-Montiel, C., González-Hernández, H., Leyva, J. L., Llanderal-Cáceres, C., Cruz-López, L., & Rojas, J. C. (2003). Evidence for a male-produced aggregation pheromone in *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 96, 1126-1131. <https://doi.org/10.1093/jee/96.4.1126>
- Ruiz-Montiel, C., García-Coapio, G., Rojas, J. C., Malo, E. A., Cruz-López, L., del Real, I., & González-Hernández, H. (2008). Aggregation pheromone of *Scyphophorus acupunctatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 127, 207-217.
- Ruiz-Montiel, C., Rojas, J. C., Cruz-López, L., & González-Hernández, H. (2009). Factors affecting pheromone release by *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 38(5), 1423-1428. <https://doi.org/10.1603/022.038.0510>
- Salcedo-Delgado, M., Figueroa-Castro, P., Hernández-Ruiz, A., De-gallier, N., González-Hernández, H., Pérez-De la O, N. B., & López-Martínez, V. (2018). Notes on three species of *Hololepta* (Leionota) Marseul, 1853 (Coleoptera: Histeridae), predators of

- the agave weevil *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, 1838 (Coleoptera: Dryophthoridae) in Mexico. *Pan-Pacific Entomologist*, 94(2):59-66. <https://doi.org/10.3956/2018-94.2.59>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). *Campaña Nacional Contra Plagas Reglamentadas del Agave*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/625684/Estrategia_Operativa_campa_a_contra_plagas_reglamentadas_del_agave.pdf
- Servicio de Información Pesquera y Alimentaria. (2023). *Producción Agrícola*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consulta: 24 de abril 2023.
- Siller, J. M. G. (1985). *Ciclo biológico en laboratorio del picudo del maguey Scyphophorus acupunctatus Gyll. (Coleoptera: Curculionidae) y algunas consideraciones sobre su impacto económico* [Tesis de licenciatura sin publicar, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Solís-Aguilar, J. F. (2001). *El picudo del agave tequilero Scyphophorus acupunctatus Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) en Jalisco, México* [Tesis de Doctorado sin publicar, Colegio de Postgraduados].
- Solís-Aguilar, J. F., González-Hernández, H., Leyva-Vázquez, J., Equihua-Martínez, A., Flores-Mendoza, F. J., & Martínez-Garza, A. (2001). *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, Plaga del agave tequilero en Jalisco, México. *Agrociencia*, 35(6), 663-670.
- Terán-Vargas, A. P., Azuara-Domínguez, A., Vega-Aquino, P., Zambrano-Gutiérrez, J., & Blanco-Montero, C. (2012). *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), in Mexico. *Southwestern Entomologist*, 37(1), 47-53.
- Vaurie, P. (19719). Review of *Scyphophorus* (Curculionidae: Rhynchophorinae). *Coleopterists Bulletin*, 25, 1-8.
- Virgen Calleros, G. (2011). Evolución histórica y situación actual de la marchitez y pudrición seca del cogollo en el cultivo del agave azul tequilero. En G. Ariel Briceño Félix, S. Hurtado de la Peña, P. Díaz Mederos, & F. Armando Pérez Mejía (eds.), *Memoria 1er Foro de Discusión Fitosanitaria en el Cultivo del Agave azul tequilero. Integrando esfuerzos para impulsar bienestar en el sector* (pp. 28-34). Editorial Digital Consejo Regulador del Tequila.

- Waring, Q. L., & Smith, R. L. (1986). Natural history and ecology of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) and its associated microbes in cultivated and native agaves. *Annals of Entomological Society of America*, 79, 334-340. <https://doi.org/10.1093/aesa/79.2.334>
- Woodruff, R. E., & Pierce, W. H. (1973). *Scyphophorus acupunctatus*, a weevil pest of yuca and agave in Florida (Coleoptera: Curculionidae). *Entomology Circular*, 135, 1-2.

2.-Ciencia y tecnología de bebidas de agave



2.1 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA Y SU INFERENCIA FUNCIONAL DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL PULQUE PARA LA DEFINICIÓN DE UN MICROBIOMA CENTRAL DE ESA BEBIDA

Fernando Astudillo Melgar¹, Martha Giles Gómez², Francisco Bolívar¹ y Adelfo Escalante^{1*}

RESUMEN

El pulque es una bebida fermentada tradicional alcohólica elaborada a partir de la fermentación de la savia o aguamiel de varias especies de maguey (*Agave*) cultivados para la producción de esta bebida. Para su producción, el aguamiel colectado de plantas en etapa de producción es agregado a un recipiente o contenedor en el que se desarrolla la fermentación y que contiene una semilla o pulque previamente fermentado. La fermentación de esta bebida resulta de la actividad de una microbiota compleja y naturalmente asociada al aguamiel y a la semilla. La aplicación de estrategias de secuenciación masiva basadas en la secuenciación de amplicones y del metagenoma de esta bebida de muestras colectadas, principalmente de la localidad de Huitzilac, Morelos, ha permitido identificar y definir una microbiota que se puede considerar como el microbioma central de la bebida y que está presente en las paredes del cajete o cavidad de la planta en la que se acumula el aguamiel, en la savia y durante las diferentes etapas de producción de la bebida. Este microbioma está conformado por los géneros bacterianos *Zymomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. 62210

² Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México. 04510

* adelfo.escalante@ibt.unam.mx

Weisella, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Obesumbacterium* y las levaduras *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces* y *Hanseniaspora* y que comprenden ~84 % del total de la diversidad bacteriana y ~99.6% de la diversidad fúngica reportadas. De forma relevante, esta diversidad correlaciona significativamente con los principales indicadores metabólicos de la fermentación, lo cual soporta su papel fundamental durante el proceso de fermentación para definir las características sensoriales de la bebida.

PALABRAS CLAVE: Pulque; aguamiel, maguey, diversidad microbiana, metagenómica.

Introducción

El pulque es una bebida fermentada alcohólica tradicional mexicana elaborada a partir de la fermentación de la savia o aguamiel, extraída de diversas especies de *Agave* o maguey pulquero, de las que destacan *A. salmiana*, *A. mapisaga* y *A. americana*. El proceso de elaboración de la bebida se ha mantenido prácticamente sin cambios desde su producción en tiempos prehispánicos, durante la Colonia y desde el auge de su producción desde la segunda mitad del siglo XIX y hasta la segunda década del siglo XX. En general, el proceso de producción del pulque inicia con la selección de plantas maduras para la producción de aguamiel con una edad promedio de al menos 5 años y comprende cuatro etapas principales, con algunas variaciones regionales: (i) castración de la planta para retirar el tejido de la piña de la planta que dará lugar al pedúnculo floral o *quiote* y elaboración del cajete, o cavidad en la cual se acumulará el aguamiel durante la vida de producción de la planta; (ii) raspado del cajete y extracción de aguamiel, actividad que se realiza dos veces por día (mañana y tarde); (iii) preparación de una semilla a partir de aguamiel de alta calidad; y (iv) la fermentación, proceso en el cual una porción de la semilla se coloca en un recipiente donde se desarrollará la fermentación y al que de forma generalizada se agrega el aguamiel colectado dos veces al día.

La duración de la fermentación es variable ya que, de acuerdo con el productor y la región, tiene una duración de unas cuantas horas (hasta 72 horas) (Figura 1). La fermentación es un proceso que depende de los microorganismos naturalmente asociados al aguamiel y aquellos presentes en la semilla (Álvarez-Ríos *et al.*, 2020; Escalante *et al.*, 2016; Moreno-Terrazas *et al.*, 2017; Valdivieso Solís *et al.*, 2021).

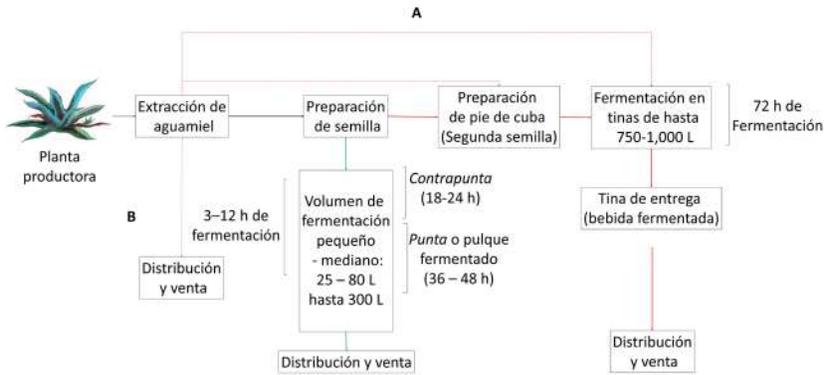


Figura 1. Proceso de elaboración tradicional de pulque
(A) Producción a mediana y gran escala. Las líneas punteadas indican la adición de aguamiel al tanque de fermentación donde se puede desarrollar el pie de cuba o la fermentación propiamente. **(B)** Producción de pulque a pequeña escala. Las líneas punteadas indican la adición de aguamiel al tanque de fermentación. Los términos de punta y contrapunta son usados por productores de pulque para referirse a un estado intermedio de la fermentación (contrapunta) y al pulque fermentado final (punta). Modificado de (Valdivieso Solís *et al.*, 2021).

El pulque es probablemente la bebida tradicional más ampliamente estudiada en México desde muchos enfoques: histórico, arqueológico, médico, microbiológico y hasta social y político (Escalante *et al.*, 2016; Moreno-Terrazas *et al.*, 2017; Ramírez Rancaño, 2000; Valdivieso Solís *et al.*, 2021). De igual forma, el cultivo de maguey para la producción de aguamiel tiene una gran relevancia desde el punto de vista agroforestal (Álvarez-Ríos *et al.*, 2020; Torres-García *et al.*, 2019; Valdivieso Solís *et al.*, 2021).

Los estudios sobre la microbiología del pulque se han enfocado en conocer la diversidad bacteriana y de levaduras presentes en el agua-

miel y en la bebida. Los trabajos pioneros sobre la microbiología del pulque publicados en la primera mitad de la década de los años 1950 reportaron el aislamiento de las bacterias *Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, dos lactobacilos –uno fermentativo y otro heterofermentativo– y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sánchez-Marroquín & Hope, 1953). El uso de estos microorganismos como inóculo para el desarrollo de una fermentación de aguamiel esterilizado permitió obtener una bebida con características sensoriales indistinguibles a las la bebida elaborada de forma tradicional (Sánchez-Marroquín *et al.*, 1957; Sánchez-Marroquín & Hope, 1953). De igual forma, se propuso que el proceso de elaboración de pulque por estos microorganismos está conformado por una fermentación alcohólica en la que participan *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*, resultado en la producción de etanol, característica distintiva de la bebida; una fermentación láctica en la que participan los lactobacilos y *L. mesenteroides*, cuyo producto principal es el ácido láctico; y la producción del exopolisacárido dextrana, por *L. mesenteroides*, responsable de conferir la viscosidad característica de la bebida (Escalante *et al.*, 2016; Sánchez-Marroquín *et al.*, 1957; Sánchez-Marroquín & Hope, 1953).

Estudios por medio de métodos moleculares no dependientes de cultivo basados en la secuenciación de una biblioteca de clonas de ADNr 16S y complementados con métodos dependientes de cultivo permitieron la detección de una mayor abundancia y diversidad de bacterias lácticas presentes tanto en aguamiel como en pulque; la presencia de bacterias ácido acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, y de una mayor diversidad, aunque en baja abundancia de diversas α - y β -Proteobacterias (Escalante *et al.*, 2004, 2008). De forma relevante, los microorganismos involucrados en la fermentación del pulque y reportados por (Sánchez-Marroquín & Hope, 1953) han sido aislados de forma sistemática de diversas muestras de pulque y aguamiel procedentes de diferentes regiones productoras de esta bebida (Escalante *et al.*, 2016), al igual que diversas levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). La aplicación de metodologías de secuenciación masiva para el análisis de la diversidad microbiana del puque, a partir de la secuenciación de

las regiones variables V3-V4 del ADNr 16S y por secuenciación de las regiones ITS amplificadas a partir del metagenoma de muestras de aguamiel y de pulque (Astudillo-Melgar *et al.*, 2023; Escobar-Zepeda *et al.*, 2020; Rocha-Arriaga *et al.*, 2020) y la secuenciación del metagenoma completo de esta bebida (Chacón-Vargas *et al.*, 2020), ha permitido la detección de una mayor diversidad microbiana en el pulque y correlacionarla con el perfil metabólico de esta bebida. En esta contribución se describen los aspectos más relevantes de la aplicación de la secuenciación masiva al análisis de la diversidad microbiana y metabólica presentes en aguamiel y pulque para la determinación de un núcleo microbiano responsable de la fermentación.

Microbiología de la fermentación del pulque

Perfil metabólico del aguamiel y diversidad microbiana asociada

El análisis de la diversidad microbiana a partir de la secuenciación del metagenoma (*metagenomic shotgun sequencing*) (Chacón-Vargas *et al.*, 2020) de una muestra de aguamiel colectado por la mañana y durante cuatro etapas de una fermentación en laboratorio: T0 (mezcla de aguamiel con pulque previamente fermentado), a las tres y seis horas de fermentación (T3 y T6, respectivamente) y en una muestra de pulque fermentado de toda la noche (PQ) colectadas de un productor de la localidad de Huitzilac, Morelos, mostró una mayor diversidad en la muestra de aguamiel con relación a la muestra fermentada (PQ) y durante las etapas T0, T3 y T6, de acuerdo a los valores de los índices de diversidad obtenidos de Shannon's (H) y de Simpson's (D). Para aguamiel los valores de H= 2.86 y D= 9.03. La diversidad detectada a nivel de género estuvo conformada por *Acinetobacter* (21.95%), *Leuconostoc* (13.92%), *Lactococcus* (13.72%), *Zymomonas* (4.77%) y *Lactobacillus* (0.97%). De forma relevante, *Saccharomyces* se detectó en una muy baja proporción (0.03%). Durante el desarrollo de la fermentación (T0, T3, T6 y PQ), esta diversidad se mantuvo prácticamente constante, en cuanto a los géneros detectados, pero con variaciones en su abundancia relativa durante las etapas de fermentación analizadas. Para

el T0 (mezcla de 2:3 partes de aguamiel: pulque), se determinaron los índices de diversidad $H = 2.43$ y $D = 5.88$, con una composición a nivel de género conformada por *Lactococcus* (19.52%), *Leuconostoc* (17.34%), *Zymomonas* (12.57%), *Saccharomyces* (10.79%), *Acinetobacter* (5.73%) y *Lactobacillus* (4.94%). Para la muestra T3 los valores de los índices de diversidad fueron $H = 2.21$ y $D =$ con una diversidad conformada por *Zymomonas* (19.91%), *Saccharomyces* (19.08%), *Leuconostoc* (12.38%), *Acinetobacter* (5.45%) y *Lactobacillus* (3.61%). Para la muestra T6 los índices de diversidad calculados fueron $H = 2.14$ y $D = 3.71$, con una diversidad conformada por *Zymomonas* (22.27%), *Lactococcus* (11.73%), *Acinetobacter* (7.17%), *Lactobacillus* (7.08%) y *Saccharomyces* (5.65%). Finalmente, para la muestra PQ los valores de $H = 2.13$ y $D = 4.10$, y los géneros más abundantes detectados fueron *Zymomonas* (21.48%), *Leuconostoc* (14.30%), *Saccharomyces* (13.51%), *Lactococcus* (13.03%), *Lactobacillus* (7.53%) y *Acinetobacter* (2.85%).

De igual forma, en este trabajo (Chacón-Vargas *et al.*, 2020) se determinó la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa como los principales azúcares presentes en el aguamiel y durante la fermentación y de los productos de fermentación etanol, ácido láctico y ácido acético en las muestras de aguamiel y en las etapas de fermentación analizadas. Estos resultados fueron utilizados para establecer una correlación de Pearson con la abundancia de aquellos microorganismos presentes a $\geq 1\%$ al menos en alguna de las etapas de fermentación. Los resultados mostraron que los géneros *Acinetobacter*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* fueron los más abundantes en el aguamiel ($>13\%$), *Lactococcus* y *Leuconostoc* presentaron una ligera fluctuación durante las 6 horas de fermentación y en la muestra PQ. Sin embargo, *Acinetobacter* mostró una disminución en su abundancia relativa durante la fermentación hasta 2.85% en la muestra PQ. La abundancia de estas bacterias mostró una correlación positiva con la concentración de glucosa durante la fermentación, la cual se incrementó desde la muestra de aguamiel hasta el T3 y una disminución para T6 y PQ. Pero se observó una correlación negativa con la concentración de fructosa, la cual se incrementó desde aguamiel hasta el T6 y disminuyó para la muestra PQ y una correlación con la concentración de etanol. La abundancia de *Zymomonas* correlacionó

positivamente con el incremento observado en la producción de etanol, ácido láctico y con el perfil de acumulación de fructosa, pero negativamente a la concentración de sacarosa.

Con relación al género *Lactobacillus*, se observó una correlación positiva con la concentración de ácido láctico y etanol. De forma sorprendente, el género *Saccharomyces*, mostró una baja abundancia en el aguamiel (0.033%), la cual tuvo una fluctuación durante las 6 horas de fermentación, para alcanzar un incremento de 13.51% en la muestra PQ y no mostró una correlación significativa con la producción de etanol. Este resultado es relevante ya que tradicionalmente se ha asociado a *S. cerevisiae* como el principal productor de etanol durante la fermentación, junto con *Z. mobilis* durante la fermentación del pulque. Los resultados obtenidos de abundancia relativa como de la correlación de esta con los principales indicadores metabólicos analizados sugieren un papel preponderante de *Zymomonas* en la producción de etanol durante la fermentación (Chacón-Vargas *et al.*, 2020).

Hacia la definición de un microbioma central responsable de la fermentación

Los resultados de Chacón-Vargas *et al.* (2020) se pueden considerar como una importante aportación para la definición de un núcleo microbiano o microbioma responsable de la fermentación del pulque y definir al aguamiel como su origen y que de forma relevante que se mantiene a lo largo de la fermentación. De esta manera, se puede establecer que los géneros *Zymomonas*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter* y *Saccharomyces* pueden ser considerados como el microbioma de la fermentación del pulque, con la excepción del género *Sphingomonas* cuya abundancia detectada en el aguamiel disminuye en un 87% al final de la fermentación (Valdivieso Solís *et al.*, 2021).

El trabajo reciente de Astudillo-Melgar *et al.* (2023) determinó, por medio de secuenciación de amplicones de la región V3-V4 del ADNr 16S (bacterias) y de las regiones ITS1 (levaduras), la composición de la diversidad microbiana y su dinámica en muestras de aguamiel colectado de tres plantas productoras aguamiel del género *A. salmiana*

de la región de Huitzilac, Morelos, durante la estación de otoño. En este trabajo se analizaron tres fermentaciones en laboratorio por cada planta muestreada: T0, T3, T6 y PQ, pero incorporando el análisis de la diversidad microbiana presente en el tejido de las paredes de cajete conocido como *metzal*. Este estudio tuvo la finalidad de determinar si el microbioma central definido por (Chacón-Vargas *et al.*, (2020) (i) se conserva o varía en muestras colectadas de la misma zona productora (Huitzilac, Morelos), (ii) si el tejido vegetal de las paredes del cajete contribuye o no al microbioma de la bebida y (iii) determinar la variación de la diversidad detectada entre las tres plantas muestreadas. Los resultados permitieron reportar 13 géneros microbianos identificados como *Zymomonas*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Obesumbacterium*, *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces* y *Hanseniaspora*. Estos géneros se detectaron en todas las muestras analizadas: *metzal*, aguamiel, T0, T3, T6 y PQ, en las tres réplicas biológicas y comprenden ~84% del total de la diversidad bacteriana reportada y ~99.6% de la diversidad fúngica. Se observó que los géneros *Zymomonas* (>60%) y *Saccharomyces* (>90%) fueron los más abundantes, manteniendo esta proporción en todas las muestras analizadas. Se determinó también que la diversidad detectada presenta una potencial correlación con los metabolitos evaluados como concentración de azúcares, etanol y ácidos orgánicos (Astudillo-Melgar *et al.*, 2023).

Los resultados obtenidos por Chacón-Vargas *et al.* (2020) y por Astudillo-Melgar *et al.* (2023) fueron comparados con los obtenidos de otros estudios de diversidad microbiana por secuenciación de amplicones. Escobar-Zepeda *et al.* (2020) reportaron el bacterioma de una mezcla de pulques de 24 y 48 horas de fermentación colectados en el municipio de Huitzilac, Morelos, reportando por primera vez la presencia OTUs de las Familias Sphingomonadaceae y Bartonellaceae, además de géneros reportados previamente. De estos resultados se destaca que *Zymomonas* (35.7%), *Leuconostoc* (8.24%), *Lactococcus* (6.29%) y *Lactobacillus* (5.51%) son los OTUs más abundantes en la muestra. Este estudio se complementó con la inferencia de genes que codifican a enzimas de algunas funciones de interés

como la biosíntesis de vitaminas asociados a la diversidad detectada (Escobar-Zepeda *et al.*, 2020).

El estudio de la diversidad bacteriana presente en el aguamiel colectado en los primeros 15-20 minutos después del raspado del cajete por secuenciación de amplicones permitió determinar a los géneros *Leuconostoc* (46.8%), *Zymomonas* (35.9%), *Acetobacter* (5%), *Lactococcus* (4.6%) y *Acinetobacter* (2.22%) como los más abundantes y que al estar presentes en el aguamiel que fluye inmediatamente después del raspado de las paredes del cajete sugiere que provienen de la planta (Peralta-García *et al.*, 2020). Rocha-Arriaga *et al.* (2020) analizaron la diversidad microbiana por secuenciación de amplicones durante el proceso de elaboración del pulque de la localidad de Tepeapulco, Hidalgo, y que incluyó el análisis de aguamiel, contrapunta (18 horas de fermentación) y pulque (36 horas de fermentación). Los resultados de este trabajo reportan 2855 OTUs de bacterias y 1494 géneros de hongos, destacando *Sphingomonas*, *Weissella*, *Saccharomyces* y *Candida* como los géneros microbianos más abundantes. De forma relevante no se reportó la presencia de *Zymomonas* y se detectó a la levadura *Candida zemplinina*. Los resultados del análisis de diversidad entre cada muestra indicaron que la diversidad bacteriana disminuye conforme se desarrolla en el proceso de elaboración del pulque, encontrando más de 50 géneros en aguamiel, 35 en contrapunta y 33 en pulque, mientras que en el caso de los hongos se reportaron más de 60 géneros en aguamiel, 22 en contrapunta y 32 en pulque aunque muchos con una abundancia relativa menor al 0.1% (Rocha-Arriaga *et al.*, 2020).

Con base en los resultados del análisis de secuenciación masiva de amplicones y del metagenoma de la fermentación del pulque descritos en esta sección, es posible proponer un microbioma central de la bebida conformado por los géneros con una abundancia relativa mayor al 1% para todos los casos (Figura 2).

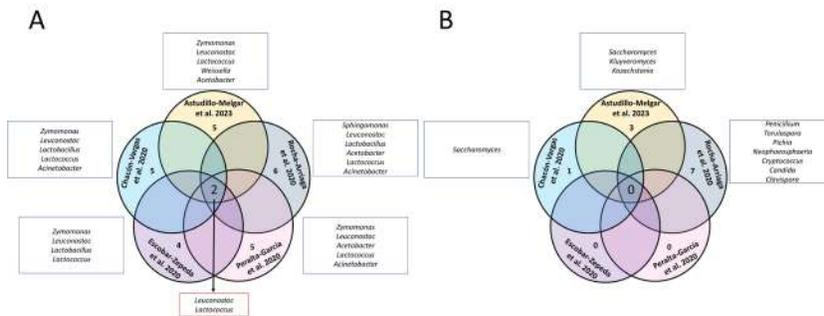


Figura 2. Principales microorganismos encontrados en los trabajos metagenómicos del pulque con una abundancia mayor al 1%
(A) Géneros de bacterias; **(B)** Géneros de hongos. Elaborada a partir de los resultados de (Astudillo-Melgar *et al.*, 2023; Chacón-Vargas *et al.*, 2020; Escobar-Zepeda *et al.*, 2020; Peralta-García *et al.*, 2020; Rocha-Arriaga *et al.*, 2020).

Conclusiones

La aplicación de los estudios metagenómicos al estudio de la diversidad genética y microbiana del pulque ha permitido expandir el conocimiento y entendimiento que se tiene sobre los microorganismos asociados a esta bebida y a su proceso de elaboración. Ha sido posible identificar un microbioma central que se conserva en todas las etapas del proceso, incluyendo el tejido vegetal asociado a las paredes del cajete o cavidad del maguey en donde se acumula el aguamiel, y en diferentes etapas de la fermentación. De igual forma, se ha correlacionado de forma significativa las variaciones en la abundancia relativa del microbioma central con los principales indicadores bioquímicos de la fermentación. Estos resultados pueden ser considerados como la base para establecer una nueva definición del pulque a nivel microbiológico y de forma importante sentar las bases para la definición de un inóculo que podría mejorar las prácticas de producción tradicional de esta bebida; sin embargo, es necesario ampliar la definición del microbioma central de la bebida a otras regiones productoras y de forma relevante evaluar su estabilidad estacional e incluso anual.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por los proyectos PAPIIT IN211420 e IN227023 (DGAPA, UNAM).

Referencias

- Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. (2020). Sistemas de manejo de maguey pulquero en México. *Revista Etnobiología*, 18(1), 3–23. <https://revistaetnobiologia.mx/index.php/etno/article/view/377>
- Astudillo-Melgar, F., Hernández-Chávez, G., Rodríguez-Alegría, M. E., Bolívar, F. & Escalante, A. (2023). Analysis of the Microbial Diversity and Population Dynamics during the Pulque Fermentation Process. *Fermentation*, 9(4), 342. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040342>
- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Escalante, A., Elena Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09599.x>
- Escalante, A., Giles-Gomez, M., Hernandez, G., Cordova-Aguilar, M., Lopez-Munguia, A., Gosset, G., & Bolivar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a

- Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Escobar-Zepeda, A., Montor, J. J., Olvera, C., Sanchez-Flores, A., & Lopez-Munguia, A. (2020). An Extended Taxonomic Profile and Metabolic Potential Analysis of Pulque Microbial Community Using Metagenomics. *Journal of Food Science & Technology*, 5(2). <https://www.siftdesk.org/article-details/An-Extended-Taxonomic-Profile-and-Metabolic-Potential-Analysis-of-Pulque-Microbial-Community-Using-Metagenomics/10637>
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Moreno-Terrazas, R., Escalante, A., Verdugo-Valdez, A. G., De la Rosa, M., Ortiz Basurto, R. I., Orantes-García, C., Palafox-González, L., Castro Díaz, A. S., & Lappe-Oliveras, P. (2017). Bebidas refrescantes y alcohólicas de agave. En A. Gschaedler Mathis (ed.) *Panorama aprovechamiento de agaves en México 1a ed.* (pp. 123–163). CONACYT, CIATEJ, AGARED.
- Peralta-García, I., González-Muñoz, F., Elena, R.-A. M., Sánchez-Flores, A., & López Munguía, A. (2020). Evolution of Fructans in Aguamiel (Agave Sap) During the Plant Production Lifetime. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.566950>
- Ramírez Rancaño, M. (2000). *El rey del pulque: Ignacio Torres Adalid y la industria pulquera*. Plaza y Valdés. UNAM, Instituto de Investigaciones Sociales.
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D., & Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, 241, 126593. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126593>

- Sánchez-Marroquín, A., & Hope, P. H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(3), 246–249. <https://doi.org/10.1021/jf60003a007>
- Sánchez-Marroquín, A., Terán, J., & Piso, J. (1957). Estudios sobre la microbiología del pulque. -XVIII.- Datos químicos de la fermentación de aguamiel con cultivos puros. *Revista de La Sociedad Química de México*, 1(3), 167–174.
- Torres-García, I., Rendón-Sandoval, F. J., Blancas, J., Casas, A., & Moreno-Calles, A. I. (2019). The genus *Agave* in agroforestry systems of Mexico. *Botanical Sciences*, 97(3), 263. <https://doi.org/10.17129/botsci.2202>
- Valdivieso Solís, D. G., Vargas Escamilla, C. A., Mondragón Contreras, N., Galván Valle, G. A., Gilés-Gómez, M., Bolívar, F., & Escalante, A. (2021). Sustainable Production of Pulque and Maguey in Mexico: Current Situation and Perspectives. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.678168>

2.2 DETERMINACIÓN DE LA SUCESIÓN DE LAS COMUNIDADES DE LEVADURAS Y DE LOS CAMBIOS FISICOQUÍMICOS EN LA PRODUCCIÓN DE PULQUE COMERCIAL EN LA HACIENDA DE XOCHUCA, TLAXCO, TLAXCALA, MÉXICO

Arredondo Fernández Rodrigo¹, Patricia E. Lappe Oliveras^{1*}, Sylvie Le Borgne², Rubén Moreno-Terrazas³ y César Ojeda Linares⁴

RESUMEN

El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana con una gran relevancia histórica, cultural y nutrimental. Se elabora por la fermentación del aguamiel de magueyes pulqueros como *Agave salmiana*, en la que participan comunidades de bacterias ácido-lácticas, ácido-acéticas y levaduras que, en conjunto, interaccionan metabólicamente para dar lugar a las propiedades fisicoquímicas y organolépticas que distinguen a esta bebida. Estas comunidades cambian la composición de sus especies que las integran conforme avanza la fermentación del aguamiel en un proceso de sucesión ecológica. En este trabajo se describieron los cambios de la diversidad de las comunidades de levaduras asociados a los cambios fisicoquímicos de cada etapa de elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, México.

¹ Instituto de Biología, UNAM, Cto. Zona Deportiva S/N, C.U., Coyoacán, 04510 Ciudad de México. *lappe@ib.unam.mx

² Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa Depto. Biotecnología y Procesos, 05348 Ciudad de México.

³ Universidad Iberoamericana, Depto. Ings. Química, Industrial y de Alimentos, 01219 Ciudad de México.

⁴ Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM, Campus Morelia, 58190 Morelia, Michoacán, México

Para ello se obtuvieron muestras de cada una de las etapas de elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca a finales de febrero de 2020. De cada muestra se realizó un aislamiento *in situ* de las levaduras en medio selectivo, así como la medición de pH y temperatura. En el laboratorio se realizó la cuantificación de las unidades formadoras de colonias y el aislamiento e identificación de los cultivos axénicos por taxonomía polifásica, considerando sus características fenotípicas y genotípicas. Mientras que la caracterización química se realizó por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y la determinación y cuantificación de los compuestos volátiles por la técnica de GC-masas.

En cuanto a los cambios de las comunidades de levaduras aisladas, se observó que en las primeras etapas del proceso, correspondientes a las muestras de aguamiel del cajete hasta el aguamiel de la castaña, se observó una mayor diversidad de especies no-*Saccharomyces* como *Candida boidinii*, *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Mejeromyces guilliermondii*, *Kazachstania gamospora* y *Zygosaccharomyces bailii* que, en general, se han reconocido como aportadoras de compuestos volátiles que enriquecen las propiedades organolépticas de alimentos y bebidas como el pulque. Esta diversidad disminuyó a medida que se consumían los azúcares y aumentaba la concentración de etanol. Las especies persistentes al final del proceso fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* y *Starmerella stellata*.

En cuanto a los cambios de los parámetros fisicoquímicos, se observó que el valor de pH descendió hasta un característico valor de 3 al final de la fermentación. En general, la concentración de la mayoría de los azúcares disminuyó a lo largo de la fermentación y el etanol alcanzó 5.5% en la etapa final. Por otra parte, entre la diversidad de los compuestos volátiles se encontraron alcoholes como el alcohol fenético y ésteres como el dietil succinato, que contribuyen a las propiedades organolépticas del pulque. Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento microbiológico y químico del pulque, que lo posicionan como un recurso biocultural complejo.

PALABRAS CLAVE: Pulque, fermentación, ecología, levaduras.

Introducción

Los alimentos fermentados son productos derivados por la interacción y desarrollo de comunidades microbianas presentes en el sustrato y en el ambiente circundante, que transforman las características bioquímicas, organolépticas y nutricionales de las materias primas, restringiendo el desarrollo de microorganismos, lo que incrementa la vida útil del producto; todo lo anterior actúa en conjunto para que estos alimentos sean más atractivos para su consumo y aceptación sociocultural (Ciani *et al.*, 2008; Steinkraus, 1994; Tamang *et al.*, 2016). Estos productos también pueden ser considerados como ecosistemas en los que se pueden observar procesos como la sucesión ecológica, que se describe como un evento dinámico de adaptación, competencia, establecimiento y supervivencia de las especies que integran las comunidades microbianas que los conforman (Scott & Sullivan, 2008; Wolfe & Dutton, 2015).

En México, los productos fermentados tienen un alto valor social, cultural, económico y nutricional para distintos grupos culturales que los preparan, consumen y comercializan en pequeña escala. Están representados por bebidas-alimento hechas a partir de maíz, frutas, savia y mosto de diversas plantas, de las cuales se han documentado que en al menos 16 bebidas fermentadas tradicionales se utilizan alrededor de 143 especies vegetales en su elaboración, cuyas familias dominantes son: Cactaceae, Asparagaceae y Poaceae (Ojeda-Linares *et al.*, 2021). Ejemplo de algunos de estas son el pozol, los atoles agrios, el tesguino, tejuino, el tepache, el colonche, el pulque y los vinos de pitaya (Escamilla-Hurtado & Escamilla-Hurtado, 2007; Steinkraus, 1996; Wacher-Rodarte *et al.*, 2015).

El pulque es una bebida prehispánica, de consistencia viscosa, de color blanquecino, ligeramente ácida y de bajo contenido alcohólico. Se elabora por la fermentación del aguamiel, una sustancia líquida rica en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales, que es extraída de diferentes especies de agaves pulqueros principalmente *A. salmiana* var. *salmiana*, *Agave mapisaga*, *A. bookeri* y *A. americana*. Estos agaves generalmente se encuentran en climas cálidos con escasas lluvias y

suelos pobres en nutrientes, principalmente en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, México, Puebla, Querétaro, Michoacán, Oaxaca y Ciudad de México (Álvarez-Ríos *et al.*, 2020; Moreno-Terrazas *et al.*, 2017; SECOFI, 1972). El pulque es un reservorio de biodiversidad microbiana resultante de las prácticas tradicionales intrínsecas de su elaboración y puede ser considerado como un ecosistema microbiano en el que las comunidades microbianas que lo conforman cambian su composición de acuerdo con los cambios de las propiedades físico-químicas del sustrato.

El estudio de la microbiología del pulque se inició desde mediados del siglo XIX con observaciones al microscopio (Gonçalves-De-Lima, 1956; Jiménez-Segura, 2016) y en la actualidad la investigación se ha centrado en la determinación *ex situ* de la microbiota en el producto final y en la sucesión de las comunidades bacterianas, entre las que se han identificado géneros bacterianos representativos como *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Serratia*, *Weisella* y *Zymomonas*, así como algunos representantes fúngicos de los cuales *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* son los más abundantes (Chacón-Vargas *et al.*, 2020; Rocha-Arriaga *et al.*, 2019; Valadez-Blanco *et al.*, 2012; Zepeda *et al.*, 2020). Estos trabajos enriquecen el conocimiento sobre la diversidad y dinámica microbiana que se desarrollan en el pulque, que lo posicionan como un recurso biocultural complejo. Sin embargo, aún existe información que aportar sobre la participación y comportamiento de las comunidades de levaduras durante el proceso de elaboración de esta bebida.

Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue contribuir en el conocimiento de la microbiota del pulque mediante el estudio del proceso de elaboración de esta bebida en la Hacienda de Xocucha, Tlaxco, Tlaxcala, México, donde se elabora a través de métodos tradicionales. Empleando técnicas microbiológicas dependientes de cultivo *in situ* e identificación polifásica, se estableció la sucesión de las comunidades de levaduras y, paralelamente, se determinaron los cambios en los parámetros físico-químicos.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Las muestras se tomaron de diferentes etapas del proceso de elaboración de pulque de la Hacienda de Xochuca, ubicada en el municipio de Tlaxco (altitud 2540 msnm, latitud 19°36'53"N, longitud 98°07'11"O, altitud 2540 msnm), en el estado de Tlaxcala, del 18 al 21 de febrero de 2020. Se tomaron muestras de 16 diferentes etapas de elaboración y fermentación del pulque comercial (Tabla 1) midiendo el pH y temperatura al momento, a excepción del *metzal*, que es el tejido sustraído del cajete durante el proceso de raspado. Cada muestra se dividió en tres fracciones de 100 mL cada una; una de ellas se utilizó para los estudios microbianos; las otras dos, para las determinaciones fisicoquímicas.

Tabla 1. Muestras obtenidas durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial de la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala

No. de muestra	Muestra
1	Aguamiel cajete
2	Aguamiel acocote
3	Aguamiel castaña
4	Semilla
5	Agua lavado
6	T0 Aguamiel + semilla
7	T1 fermentación 4h
8	T2 fermentación 8 h
9	T3 fermentación 12 h
10	T4 fermentación 20 h
11	T5 fermentación 24 h
12	<i>Metzal</i>
13	<i>Xaxtle</i>
14	Raspado cajete
15	T6 fermentación 48 h
16	T7 fermentación 72 h

Metzal: tejido sustraído del cajete durante el proceso de raspado; *Xaxtle*: Sedimento que deja el pulque en la tina de fermentación

Estudio microbiológico

a) Aislamiento, cuantificación y conservación

De cada muestra se realizaron diluciones seriadas de las que se tomaron alícuotas para ser inoculadas *in situ* por el método de extensión en placa de medio en medio WLA (Alpha Biosciences, Baltimore, MD, EUA) adicionado con cloranfenicol (100 µg/mL, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Estas cajas se incubaron en el laboratorio y fueron revisadas durante 10 días a temperatura ambiente, periodo en el que fueron revisadas diariamente para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

b) Obtención de cultivos axénicos

A partir de las características macroscópicas únicas de cada colonia (color, forma, elevación, brillo, textura y borde), se seleccionaron, aislaron y resembraron por estriado nuevamente en WLA hasta la obtención de cultivos axénicos que se resembraron en placas de YPD (glucosa 20g, extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, agar 20 g, H₂O d 1000 mL).

La identificación fenotípica de los cultivos axénicos se hizo considerando las características morfológicas macro y microscópicas, fisiológicas y bioquímicas (Van-der-Walt & Yarrow, 1984).

c) Identificación molecular

La identificación genotípica de los cultivos axénicos seleccionados de cepas aisladas se hizo a través del análisis de secuencias de la región ITS-5.8S. Para ello se realizó una extracción de ADN genómico con el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, EUA). La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 se llevó a cabo con los iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTTGCGG'3) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTAGATATGC'3) (White *et al.*, 1990). La amplificación fue realizada en un termociclador modelo Bio-Rad Mycycler (Bio-

Rad, CA, EUA), utilizando el siguiente programa de condiciones: una etapa de desnaturalización inicial de 15 min a 95 °C seguida de 35 ciclos: 1 min a 94 °C, 2 min a 55.5 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C (White *et al.*, 1990). Todos los productos de amplificación fueron secuenciados por el método de reacción de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa UGENE v42.0 (Okonechnikov *et al.*, 2022) y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank utilizando el programa BLASTN en línea (Altschul *et al.*, 1997), considerando como de la misma especie aquellas con un 99 al 100% de similitud.

Estudio de la diversidad y de la sucesión microbiana

La diversidad alfa de cada una de las muestras se determinó utilizando el índice de diversidad de Shannon calculado con la fórmula $-\sum p_i \ln(p_i)$ [p_i =proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos] para cada tiempo de fermentación (Kirchmayr *et al.*, 2017). Para evaluar el cambio de diversidad entre las muestras se determinó la diversidad beta a través del índice de Sorensen ($I_s = \frac{2c}{a+b}$) (Franco-López, 2011; Moreno, 2001). Con el uso de librerías de análisis ecológico del entorno de programación “R” (versión 4.2.1) y aplicando el modelo de aglomeración UPGMA se construyó un dendrograma que resume y representa gráficamente el recambio de especies a lo largo de las etapas evaluadas a lo largo del proceso de elaboración y fermentación del pulque en la Hacienda de Xochuca (Baselga *et al.*, 2022; Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011; Oksanen *et al.*, 2020).

Estudios fisicoquímicos

La temperatura y acidez fueron evaluadas *in situ* al momento de tomar las respectivas muestras. La concentración de glucosa, fructosa, sacarosa, ácido láctico, ácido acético y etanol de cada una de las muestras fue obtenida por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Costa *et al.*, 2016), mientras que la evaluación

del contenido de compuestos volátiles se realizó por cromatografía de gases (HPLC GC-MS), se inició con una técnica de extracción líquido-líquido (Abad-Fitz *et al.*, 2020).

Resultados y discusión

Estudio microbiológico

En cuanto al conteo de las levaduras viables (UFC/mL), se puede observar que presentan una tendencia ascendente hasta la última muestra evaluada, correspondiente a las 72 horas de fermentación (Figura 1), similar al de otros procesos fermentativos donde al final quedan aquellas levaduras ácido-tolerantes, como ocurre en el caso de la kombucha (Teoh *et al.*, 2004). Esta disminución se asocia al proceso de deterioro del producto, por el contenido de etanol, la oxidación de varios compuestos orgánicos como los aminoácidos y el agotamiento de los carbohidratos (Escalante *et al.*, 2016; Jeong *et al.*, 2013).



Figura 1. Cuantificación de las levaduras viables (UFC/mL) aisladas en las diferentes etapas de elaboración y fermentación del pulque de la Hacienda Xochuca

Los resultados de la identificación fenotípica y molecular permitieron caracterizar la diversidad de levaduras aisladas de cada una de las etapas de elaboración del pulque, así como su respectivo índice de Shannon (Tabla 2) (Kirchmayr *et al.*, 2017).

Tabla 2. Diversidad temporal de las levaduras en de cada etapa del
proceso de elaboración de pulque de la Hacienda de Xochuca

Especies	MUESTRAS														Total	
	Pared-cajete	Aguamiel cajete	Aguamiel acocote	Aguamiel castaña	Scmilla	T0	T1 (4h)	T2 (8h)	T3 (12 h)	T4 (20 h)	T5 (24h)	T6 (48h)	T7 (72h)	Xaxtle		Agua lavado
<i>Candida boidinii</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Clavispora lusitaniae</i>	1	1	3	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>Clavispora sp.</i> (UBC)	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Kazachstania gamospora</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0	2	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>Kluyveromyces sp.</i> (UBC)	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0	0	1	2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	7
<i>Meyerozyma sp.</i> (UBC)	2	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1	2	0	1	0	0	8
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	0	0	0	1	0	1	2	0	2	1	0	1	0	0	2	10
<i>Saccharomyces sp.</i> (UBC)	0	1	0	0	1	3	1	0	0	0	1	3	1	1	1	13
<i>Starmerella stellata</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	0	0	0	6
<i>Starmerella sp.</i> (UBC)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	4
<i>Zygosaccharomyces balii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total de aislados identificados	3	5	11	9	4	5	9	4	5	5	5	6	2	2	5	80
Índice de Shannon (H')	0.6365	1.3321	1.3761	1.3030	1.0397	0.9502	2.1594	1.3862	1.3321	1.3321	1.3321	1.0114	0.6931	0.6931	1.3321	2.6310

UBC= Unidad básica de caracterización (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011)

La particular diversidad inicial de levaduras no-*Saccharomyces* es característica de procesos de fermentación espontánea o de aquellos que se llevan a cabo en condiciones aerobias con una constante interacción a la intemperie y con vectores que transportan e integran especies a la comunidad de estas levaduras que, además, son de interés biotecnológico por el aporte de compuestos aromáticos que contribuyen con el enriquecimiento de las características organolépticas a bebidas como el vino (Varela, 2016), la kombucha (Teoh *et al.*, 2004) y el pulque. Esta diversidad disminuyó a medida que se consumían los azúcares y aumentaba la concentración de etanol. Las especies persistentes al final del proceso fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* y *Starmerella stellata*.

Al observar los cambios en la diversidad de las levaduras aisladas e identificadas que son congruentes con el dendrograma construido a partir de los índices de similitud (Figura 2), en el que se pueden ver tres grupos principales: 1) las muestras iniciales de aguamiel obtenidas en el exterior del tinacal, 2) desde el tiempo cero hasta las 48 horas de fermentación y 3) la *semilla*, las últimas etapas de fermentación y las muestras residuales.

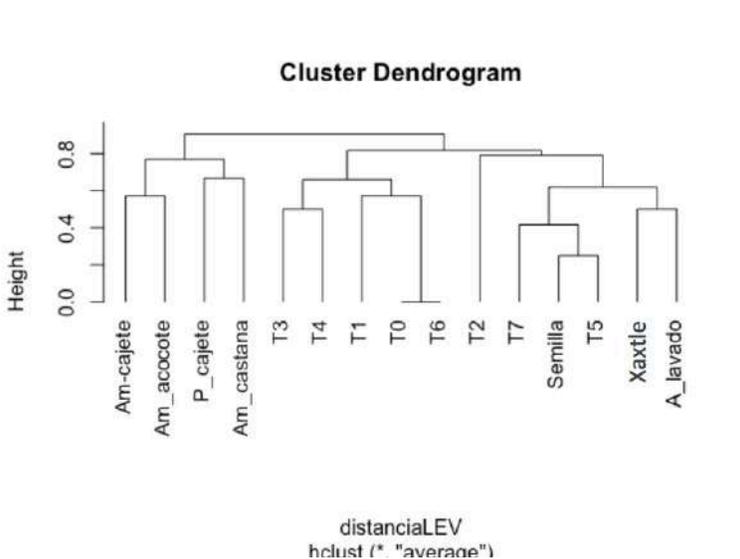


Figura 2. Dendrograma que representa el recambio de especies de levaduras entre muestras, formando grupos de acuerdo con su parecido en diversidad

En cuanto a los cambios de los parámetros fisicoquímicos, se observó que el valor de pH descendió de 5 en el aguamiel a 3 después de 72 horas de fermentación. La concentración de los ácidos láctico y acético se mantuvo en valores <1%; el contenido de azúcares disminuyó en términos generales a lo largo de la fermentación y el etanol alcanzó 5.5% en la etapa final (Figura 3). En cuanto a la diversidad de compuestos volátiles (Figura 4), se encontraron alcoholes como el alcohol fenetílico producido por levaduras encontradas en este trabajo como *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, entre otras (Chreptowicz *et al.*, 2018; Mitri *et al.*, 2022; NCBI, 2022; Qian *et al.*, 2019); y ésteres como el dietil succinato, asociado principalmente a levaduras del género *Saccharomyces* encontrado también durante la elaboración de vinos (Antonelli *et al.*, 1999; Sottit *et al.*, 2019) y en takjou, una bebida fermentada tradicional de Corea (Jung *et al.*, 2016) que, junto con otros compuestos volátiles encontrados, contribuyen a las propiedades organolépticas del pulque.

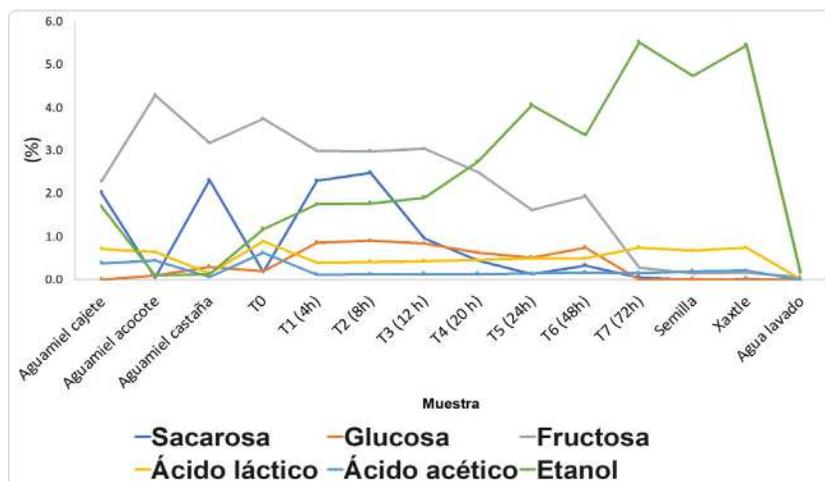


Figura 3. Cambios en la concentración porcentual de los metabolitos principales del pulque a lo largo de su proceso de elaboración

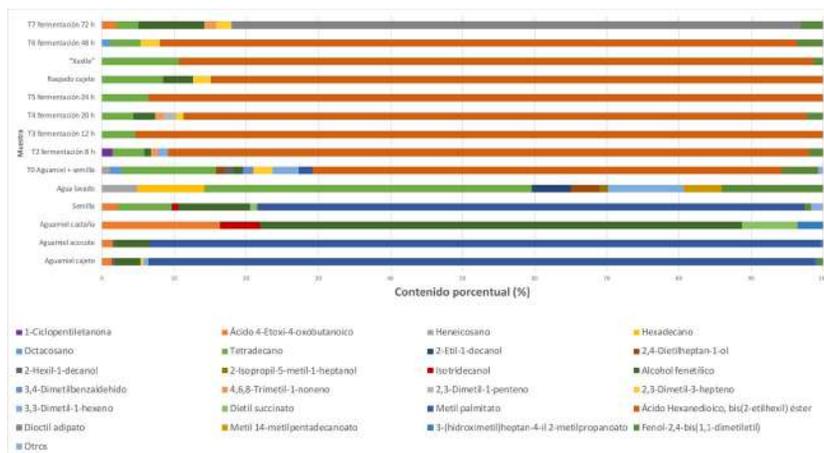


Figura 4. Composición porcentual de los compuestos volátiles encontrados en cada muestra estudiada durante la producción de pulque en la Hacienda de Xochuca

Conclusiones

A lo largo del proceso de elaboración del pulque en la Hacienda de Xochuca se pudieron observar cambios en la diversidad de las comunidades de levaduras aisladas de acuerdo con un proceso de sucesión ecológica en congruencia con los cambios de las condiciones fisicoquímicas resultantes del aguamiel hasta su transformación en pulque.

La densidad de población de levaduras tuvo un comportamiento ascendente conforme avanzaba el proceso de fermentación hasta que el pH y la concentración de etanol volvieron las condiciones fisicoquímicas más selectivas.

La mayor diversidad de levaduras se encuentra al inicio del proceso, pues el aguamiel es un sustrato rico en azúcares que está en contacto con el ambiente en el que se pueden encontrar vectores asociados a levaduras y otros microorganismos que participan durante la producción del pulque. La menor diversidad de levaduras se encontró en las etapas finales del proceso de acuerdo con el agotamiento de los azúcares, un pH más bajo y una concentración más alta de etanol,

resistiendo solo aquellas que mostraron una mayor tolerancia al etanol como *Starmerella stellata* y representantes del género *Saccharomyces*.

El contenido de etanol se fue incrementando desde las primeras etapas del proceso, lo que indica que incluso antes de usar un inóculo la fermentación alcohólica ya había iniciado espontáneamente.

La presencia de levaduras no-*Saccharomyces*, como *Clavispora lusitanae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Meyerozyma guilliermondii*, se puede asociar con la presencia de compuestos volátiles, como el alcohol fenético y el dietil succinato, que enriquecen las propiedades sensoriales del pulque.

Referencias

- Abad-Fitz, I., Maldonado-Almanza, B., Aguilar-Dorantes, K. M., Sánchez-Méndez, L., Gómez-Caudillo, L., Casas, A., Blancas, J., García-Rodríguez, Y. M., Beltrán-Rodríguez, L., Sierra-Huelsz, J. A., Cristians, S., Moreno-Calles, A. I., Torres-García, I. & Espinosa-García, F. J. (2020). Consequences of Traditional Management in the Production and Quality of Copal Resin (*Bursera bipinnata* (Moc. & Sessé ex DC.) Engl.) in Mexico. *Forests*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/f11090991>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J. & Casas, A. (2020). Sistemas de manejo de maguey pulquero en México. *Etnobiología*, 18(2), 3–23.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C. & Carnacini, A. (1999). Yeast Influence on Volatile Composition of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1139–1144. <https://doi.org/10.1021/jf9807317>
- Baselga, A., Orme, D., Villeger, S., Bortoli, J. D., Leprieur, F., Logez, M. & Henriques-Silva, R. (2022). *Partitioning Beta Diversity into Turnover and Nestedness Components (1.5.5) [R]*. <https://CRAN.R-project.org/package=betapart>

- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A. & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 10(1), 15115. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Chreptowicz, K., Sternicka, M. K., Kowalska, P. D. & Mierzejewska, J. (2018). Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media. *Letters in Applied Microbiology*, 66(2), 153–160. <https://doi.org/10.1111/lam.12835>
- Ciani, M., Comitini, F. & Mannazzu, I. (2008). Fermentation. *Encyclopedia of Ecology*, 1548–1557. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00272-X>
- Costa, M. P. da, Frasso, B. da S., Lima, B. R. C. da C., Rodrigues, B. L. & Junior, C. A. C. (2016). Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. *Talanta*, 152, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.061>
- Escalante, A., Soto, D. R. L., Gutiérrez, J. E. V., Giles-Gómez, M., Bolívar, F. & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Escamilla-Hurtado, M. & Escamilla-Hurtado, M. G. (2007). Los alimentos fermentados que comían nuestros bisabuelos prehispánicos. *Ciencias*, 58(2).
- Franco-López, J. (2011). 29. Sucesión de protozoarios. En J. F. López (ed), *Ecología y Conservación. Laboratorio y Campo* (pp. 207–210). Trillas.
- Gonçalves-De-Lima, O. (1956). *El maguey y el pulque en los códices mexicanos*. Fondo de Cultura Económica.
- Jeong, S. H., Jung, J. Y., Lee, S. H., Jin, H. M. & Jeon, C. O. (2013). Microbial succession and metabolite changes during fermentation of dongchimi, traditional Korean watery kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.016>

- Jiménez-Segura, V. H. (2016). *Caracterización de la diversidad de levaduras durante la fermentación de pulque de la hacienda de Xochuca en Tlaxco, Tlaxcala*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Jung, W. Y., Jung, J. Y., Lee, H. J. & Jeon, C. O. (2016). Functional Characterization of Bacterial Communities Responsible for Fermentation of Doenjang: A Traditional Korean Fermented Soybean Paste. *Frontiers in Microbiology*, 7, 827. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00827>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Rosa, M. de la & Mathis, A. G. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT - Food Science and Technology*, 79(Nucleic Acids Research. 25 1997), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Mitri, S., Koubaa, M., Maroun, R. G., Rossignol, T., Nicaud, J. M. & Louka, N. (2022). Bioproduction of 2-Phenylethanol through Yeast Fermentation on Synthetic Media and on Agro-Industrial Waste and By-Products: A Review. *Foods*, 11(1), 109. <https://doi.org/10.3390/foods11010109>
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad (CYTED & ORCYT-UNESCO, Eds.; Vol. 1). M&T-Manuales y Tesis SEA.
- Moreno-Terrazas, R., Lappe-Oliveras, P. E. & Larralde-Corona, C. P. (2017). Bebidas tradicionales y nuevas alternativas. En A. Gschaedler (ed.), *Panorama del aprovechamiento de los agaves en México* (pp. 121-198). CIATEJ, AGARED, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).
- National Library of Medicine. (2022). *PubChem Compound Summary for CID 6054, 2-Phenylethanol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Phenylethanol>
- Núñez-Colín, C. A. & Escobedo-López, D. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415–427.

- Ojeda-Linares, C., Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., Islas, L. A., Lappe-Oliveras, P., Nabhan, G. P., Torres-García, I., Vallejo, M. & Casas, A. (2021). Traditional Fermented Beverages of Mexico: A Biocultural Unseen Foodscape. *Foods*, 10(10), 2390. <https://doi.org/10.3390/foods10102390>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & Team, U. (2022). *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit (42.0) [MacOS]*. *Bioinformatics*. <http://ugene.net/>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. & Wagner, H. (2020). *Community Ecology Package (2.5-7) [R]*. <https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>
- Qian, X., Yan, W., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Ochsenreither, K., Jiang, M. & Xin, F. (2019). Current status and perspectives of 2-phenylethanol production through biological processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(2), 235–248. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1530634>
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D. & Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a major biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, 241, 126593. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126593>
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Scott, R. & Sullivan, W. C. (2008). Ecology of fermented foods. *Human Ecology Review*, 15(1).
- SECOFI. (1972). *NMX-V-037-1972. PULQUE MANEJADO A GRANEL*.
- Sottit, C., Salor-Torregrosa, J. M., Moreno-García, J., Peinado, J., Mauricio, J. C., Moreno, J. & García-Martínez, T. (2019). Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *European Food Research and*

- Technology*, 245(12), 2705–2714. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>
- Steinkraus, K. H. (1994). Nutritional significance of fermented foods. *Food Research International*, 27(3), 259–267. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90094-9)
- Steinkraus, K. H. (1996). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker, Inc.
- Tamang, J. P., Watanabe, K. & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Teoh, A. L., Heard, G. & Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I. & Montville, T. J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>
- Van-der-Walt, J. P. & Yarrow, D. (1984). Chapter II. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. En C. P. Kurtzman & J. W. Fell (eds.), *The Yeast. A taxonomic study (4th ed.)*. Elsevier.
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Wacher-Rodarte, C., Díaz-Ruíz, G., Lappe-Oliveras, P. & Moreno-Terrazas, R. C. (2015). Capítulo 25. Alimentos indígenas fermentados. En B. E. García Almendárez, C. Regalado González, I. Guerrero Legarreta, C. Wacher Rodarte, *Microbiología de los alimentos*. Limusa/Noriega Editores.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*, 18, 315–322.

- Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. (2015). Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell*, 161(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>
- Zepeda, A. E., Montor, J. J., Olvera, C., Sanchez-Flores, A. & Lopez-Munguia, A. (2020). An Extended Taxonomic Profile and Metabolic Potential Analysis of Pulque Microbial Community Using Metagenomics. *SDRP Journal of Food Science & Technology*, 5(2), 83–97. <https://doi.org/10.25177/jfst.5.2.ra.10637>

2.3 CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA Y EVALUACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN FERMENTACIONES DE MEZCAL DEL ESTADO DE OAXACA

René Quezada Romero¹, J. Alejandro Morales Valencia², Manuel R. Kirchmayr¹, Melchor Arellano Plaza¹, John Morrissey³ y Anne C. Gschaedler Mathis^{1*}

RESUMEN

Las fermentaciones artesanales de mezcal son procesos complejos no solo en cuanto a su elaboración, sino también debido a la gran cantidad de factores involucrados en el proceso. Dentro de estos factores encontramos el tipo de agave utilizado, la concentración de azúcares, la presencia de inhibidores, la variedad de microorganismos involucrados en dicho proceso, entre otros. Por lo cual se ha podido observar una variación no solo entre diferentes fábricas, sino también entre fermentaciones en la misma fábrica. Los microorganismos presentes en la fermentación están involucrados no solo en la producción de etanol, gran parte de las levaduras no-*Saccharomyces* son las responsables de la síntesis de compuestos orgánicos, los cuales brindan propiedades organolépticas características al producto obtenido de la fermentación. La caracterización del perfil de compuestos volátiles y la identificación de los microorganismos nos permite establecer relaciones entre estos y las propiedades organolépticas presentes en el producto final. El análisis metagenómico se vuelve una herramienta con una gran utilidad, no solo para la identificación

¹ CIATEJ, Departamento de Biotecnología Industrial, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, 45019. * agschaedler@ciatej.mx

² CUCEI, Universidad de Guadalajara, Departamento de Ciencias Computacionales, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México, 44430.

³ University Collage Cork, Departamento de Microbiología, Cork, Irlanda.

de los microorganismos; además, proporciona información sobre su diversidad y abundancia relativa, lo que permite ampliar el panorama de los consorcios microbianos que se encuentran en este proceso. El presente trabajo nos permitió identificar los microorganismos y los compuestos sintetizados por estos, de esta forma poder entender un poco más la complejidad de estos procesos fermentativos, apreciando que incluso dentro de la misma fábrica los factores antes mencionados pueden jugar un papel muy importante durante cada fermentación.

PALABRAS CLAVE: Metagenómica, fermentación, éster, microorganismo, mezcal.

Introducción

Existe una amplia gama de bebidas alcohólicas derivadas del agave donde los procesos de producción varían entre cada región y donde la microbiota involucrada durante la etapa de fermentación es muy diversa (Lappe Oliveras *et al.*, 2008).

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional obtenida de la fermentación de diferentes especies de agave. El mezcal se considera la segunda bebida derivada del agave de mayor importancia económica en México, justo después del tequila. Se encuentra protegida por una Denominación de Origen (DOM) y por la Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-2016). Dentro de la DOM se encuentran en su totalidad los estados de Durango, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí y Zacatecas; mientras que solo algunos municipios de Aguascalientes, Estado de México, Guanajuato, Michoacán, Morelos, Puebla, Sinaloa y Tamaulipas están incluidos. En la elaboración de esta bebida se utilizan más de 50 especies de agave diferentes, además, de acuerdo con el método de producción utilizado, este se puede clasificar en mezcal, mezcal artesanal y mezcal ancestral (Arellano Plaza *et al.*, 2022; NOM-070-SCFI, 2016).

El análisis metagenómico es una herramienta que permite determinar la identidad taxonómica, así como la abundancia relativa de cada población microbiana. De esta manera se proporciona información

sobre comunidades microbianas menos exploradas. Este tipo de análisis se lleva a cabo mediante una secuenciación masiva a través de la plataforma Illumina utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación, las cuales combinan el ADN genómico de interés con cebadores para amplificar regiones específicas mediante PCR. El uso de las regiones V3 y V4 del ARNr 16S para bacterias y de las regiones ITS1-ITS2 para levaduras permite identificar los microorganismos presentes en una muestra de ADN específica. En esta técnica se genera una biblioteca para la secuenciación; cada secuencia representa un único producto de ADN, y se pueden analizar una gran cantidad de muestras simultáneamente (Villarreal-Morales *et al.*, 2018). En una muestra fermentada el uso del análisis metagenómico puede ayudarnos a describir las poblaciones autóctonas de microorganismos de una región (Papalexandratou *et al.*, 2019).

Se ha observado que las fermentaciones con jugo de agave presentan una gran diversidad de microorganismos, tanto levaduras como bacterias, los cuales se han identificado mediante el uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo, encontrando especies de los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces* y *Zygosaccharomyces* en el caso de levaduras; mientras que en el caso de bacterias destacan *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Komagataeibacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weisella* y *Zymomonas* (Escalante-Minakata *et al.*, 2008; Jacques-Hernández *et al.*, 2009; Kirchmayr *et al.*, 2017; Lachance, 1995; Lappe Oliveras *et al.*, 2008; Martell Nevárez *et al.*, 2009; Narvaez-Zapata *et al.*, 2010; Rocha-Arriaga *et al.*, 2020).

Durante las fermentaciones alcohólicas se producen una gran variedad de compuestos volátiles, pero la mayor producción de etanol es generada por *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, la cantidad y tipo de compuestos volátiles tienden a incrementarse por levaduras no-*Saccharomyces* (Liu *et al.*, 2019). El objetivo de este estudio fue determinar el impacto de diferentes especies de Agave sobre el consorcio microbiano durante la etapa de fermentación, y la producción de compuestos volátiles.

Materiales y métodos

Muestras biológicas

Las muestras analizadas durante este trabajo corresponden a jugos de agave utilizado en la producción de mezcal del estado de Oaxaca, correspondientes a dos especies diferentes de agave (*A. americana* var. *oaxacensis* y *A. angustifolia* Haw) tomadas durante tres etapas de la fermentación (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de muestras analizadas

Nombre	Tipo de agave	Etapas de fermentación	Fecha de muestreo	Tiempo de fermentación
F1	<i>Agave americana</i> var. <i>Oaxacensis</i>	Inicio	02/10/2020	9 días
		Intermedio	05/10/2020	
		Fin	11/10/2020	
F2	<i>Agave angustifolia</i> Haw	Inicio	06/10/2020	11 días
		Intermedio	10/10/2020	
		Fin	17/10/2020	

Análisis metagenómico

El ADN de los microorganismos presentes en los jugos de agave se extrajo siguiendo la metodología descrita por (Kirchmayr *et al.*, 2011) usando el kit comercial GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit de Sigma Aldrich®. La secuenciación se realizó en Novogene Corporation (EE.UU.) mediante la plataforma MiSeq PE250 (paired-end). Para levaduras se utilizaron los cebadores ITS5-1737F (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) y ITS2-2043R (GCTGCG-TTCITTCATCGATGC). Para bacterias, la región V3-V4 se amplificó utilizando los cebadores 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) y 806R (GGACTACNNNGGGTATCTAAT).

La bioinformática del microbioma se realizó en la plataforma QIIME 2 2022.2 (Bolyen *et al.*, 2019). Los datos de secuencia sin procesar se demultiplexaron y se filtró la calidad utilizando el plugin q2-demux seguido de denoising con DADA2 a través de q2-dada2 (Callahan *et*

al., 2016). Todas las variantes de secuencia de amplicones (ASV) se alinearon con mafft mediante q2-alignment (Katoh *et al.*, 2002) y se utilizaron para construir una filogenia con FastTree2 mediante q2-phylogeny (Price *et al.*, 2010). La taxonomía se asignó a las ASV utilizando la base de datos q2-feature-classifier y Silva-138-99-nb-classifier (Quast *et al.*, 2012) para bacterias y UNITE-ver8-99-classifier (Nilsson *et al.*, 2019) para levaduras (Lozupone & Knight, 2005; Robeson *et al.*, 2020).

Cuantificación de compuestos volátiles por GC-MS

Para la determinación de compuestos volátiles y etanol, los mostos fueron inyectados en un equipo Head Space Hewlett Packard modelo HP 7694E acoplado a un cromatógrafo de gases (GC) Hewlett Packard modelo HP 6890 con un detector de ionización de llama (FID). Cada vial contenía 2 mL de muestra y fue sellado. El equipo fue programado con las siguientes condiciones: temperatura del vial 80°C, temperatura del lazo 110°C, temperatura de la línea de transferencia 115°C equilibrio del vial 5 minutos, tiempo de presurización 0.2 minutos, tiempo de llenado del lazo 0.2 minutos, tiempo de equilibrio del lazo 0.5 minutos, tiempo de inyección 1 minuto y finalmente volumen de inyección de 1 mL. Para el GC HP6890 acoplado al FID se utilizaron las siguientes condiciones; el horno se programó a 55 °C durante 5 minutos, seguido de dos incrementos de temperatura, el primero a 5 °C/minuto hasta 160 °C, y el segundo de 25 °C/minuto hasta 220 °C, y se mantuvo a 220 °C durante 8 minutos. La columna cromatográfica era una columna HP Innowax de 60 m x 0,32 mm x 0,25 µm. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C. La identificación de los compuestos en los cromatogramas se realizó a partir de los tiempos de retención, y para su cuantificación se utilizaron curvas patrón para interpolar el valor del área de cada pico obtenido a partir del cromatograma. (Arellano *et al.*, 2012).

Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC

Las muestras de conjunto de agave fueron previamente microfiltradas y colocadas en tubos de vidrio de 2 mL. La cuantificación de carbohi-

dratos, glicerol y ácidos orgánicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) inyectando 20 μL en un cromatógrafo Waters equipado con un detector de índice de refracción (RID Refractive Index Detector) y una columna Biorad Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, 9 μm). La columna se mantuvo a 50 $^{\circ}\text{C}$ y se utilizó H_2SO_4 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/minuto durante 30 minutos. Los ácidos orgánicos se cuantificaron mediante un detector UV de longitud de onda a 210 nm.

Resultados y discusión

La eficiencia de producción de etanol durante las fermentaciones estuvo entre 38 y 47%, siendo la fermentación con *A. angustifolia* la que mayor eficiencia presentó. La figura 1 nos permite evidenciar el consumo de azúcares y la producción de etanol, datos utilizados para calcular la eficiencia en la producción de etanol. Estos rangos porcentuales de eficiencia en la producción de etanol se han podido observar en otras investigaciones; fermentaciones con *A. angustifolia* de Oaxaca presentaron eficiencia entre 34 y 62 % en dos fábricas diferentes (Kirchmayr *et al.*, 2017). En otras investigaciones se han reportado eficiencias entre 39 a 53% con diferentes tipos de agaves, en el estudio de Medina Valtierra *et al.* (2011) se reportó un 39% de eficiencia con *A. karwinskii* y con *A. angustifolia* de 42 y 45%.

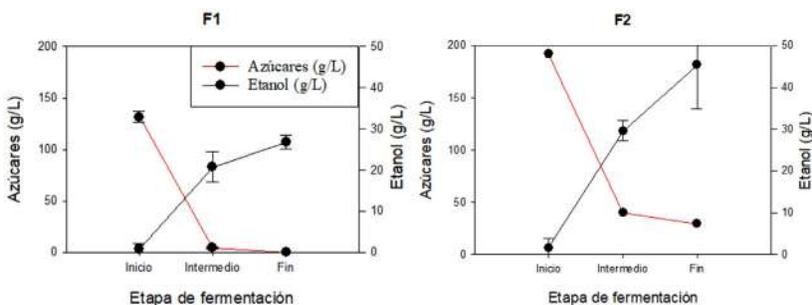


Figura 1. Concentración de azúcares y producción de etanol en fermentación F1 y F2

Continuando con la identificación microbiana mediante análisis metagenómico, se observaron algunas diferencias entre las dos fermentaciones; sin embargo, en ambas fermentaciones el 90 a 95% de la abundancia relativa de levaduras en cada etapa de la fermentación está integrado por los géneros *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Citeromyces* y *Pichia*; mientras que en el caso de bacterias, el 90 a 95% lo integran los géneros *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia* y *Pediococcus*. En ambas fermentaciones la levadura dominante fue el género *Hanseniaspora* con una abundancia de 62% al inicio y 74% al final de la fermentación F1, mientras que en la F2 esta levadura tuvo una abundancia inicial de 77% y final de 82%. El género *Torulaspora* ocupó el segundo lugar de abundancia al inicio de ambas fermentaciones; sin embargo, la concentración disminuyó conforme la fermentación avanzó, tal como se aprecia en la Figura 2. Este resultado es inusual porque la levadura predominante en fermentaciones es comúnmente *S. cerevisiae*. Las poblaciones bacterianas también fueron identificadas, los resultados se pueden apreciar en la Figura 3, en la cual se muestra cómo al inicio la dominancia de bacterias lácticas *Weissella* y *Leuconostoc*, correspondientes a la familia Leuconostocaceae, ocupan una abundancia del 78% en la F1 y del 42% en la F2, así mismo, se observa cómo esta abundancia disminuye con el avance de la fermentación. El género *Lactobacillus* incrementa durante el avance de la fermentación encontrando una abundancia al final del proceso del 62% en la F1 y 50% en la F2. Por otro lado, las bacterias acéticas como *Komagataeibacter* y *Acetobacter* también incrementan su abundancia con el avance de la fermentación.

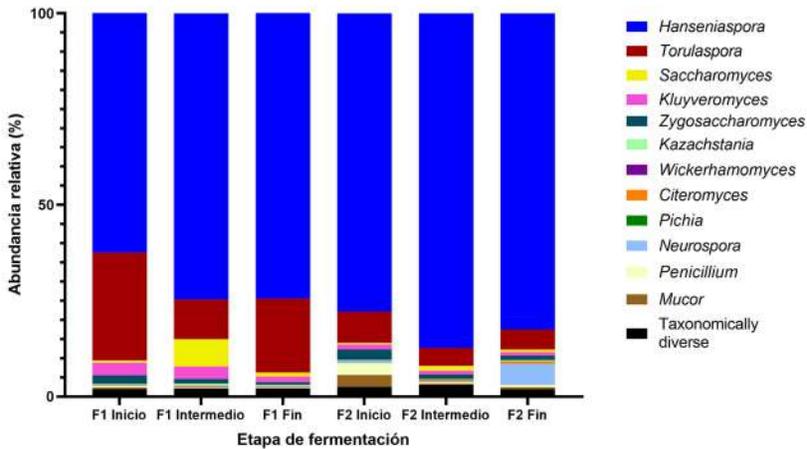


Figura 2. Abundancia relativa de levaduras y hongos en las fermentaciones F1 y F2

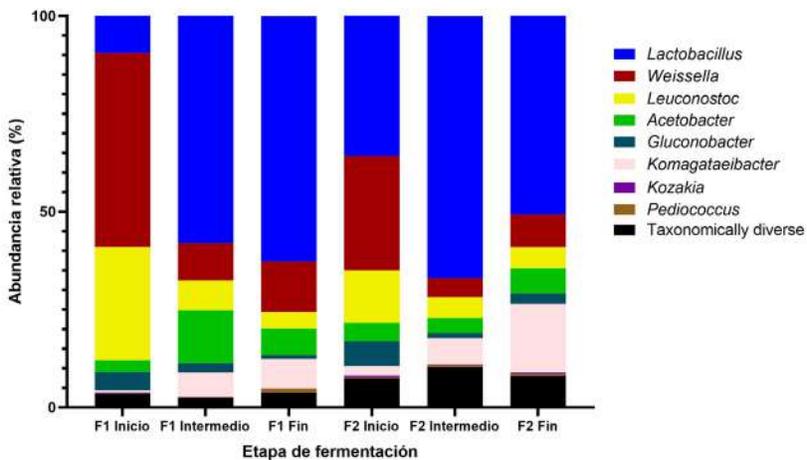


Figura 3. Abundancia relativa de bacterias en las fermentaciones F1 y F2

Entre los compuestos volátiles cuantificados, el que más destacó en los resultados fue el lactato de etilo, alcanzando 230 mg/L en F1 y 300 mg/L en F2 al final de las fermentaciones. La concentración final de acetato de etilo en F1 fue de 470 mg/L y de 550 mg/L en F2, dichos resultados se pueden apreciar en la Figura 4. La concentración

de ácido láctico y acético, que fueron los más abundantes durante la fermentación, se observan en la Figura 5 encontrando concentraciones finales de ácido láctico entre 9 y 15 g/L; mientras que en el caso de ácido acético, las concentraciones finales se alcanzaron entre 1 y 5 g/L. En ambos casos, estas concentraciones de ésteres fueron superiores a las reportadas en otras fermentaciones. Kirchmayr *et al.* (2017) reportaron concentraciones entre 18 y 48 mg/L de lactato de etilo en fermentaciones con *A. angustifolia* en el estado de Oaxaca; en el año 2012 y el mismo estado, Vera-Guzmán *et al.* (2012) reportaron la cuantificación de acetato de etilo en fermentaciones con *Agave angustifolia* Haw, obteniendo concentraciones de 14 a 35 mg/L. En el caso de ácidos orgánicos, las concentraciones se mantuvieron relativamente parecidas, ya que Narváez-Zapata *et al.* (2010) reportaron la cuantificación de ácido láctico de 2.83 a 15.84 g/L y ácido acético de 6.87 a 8.82 g/L en fermentaciones de Tamaulipas con *A. angustifolia*, *A. lechuguilla* y *A. americana*.

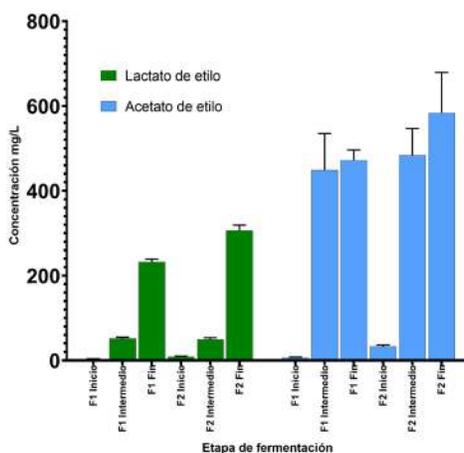


Figura 4. Ésteres en mayor concentración generados en las fermentaciones F1 y F2

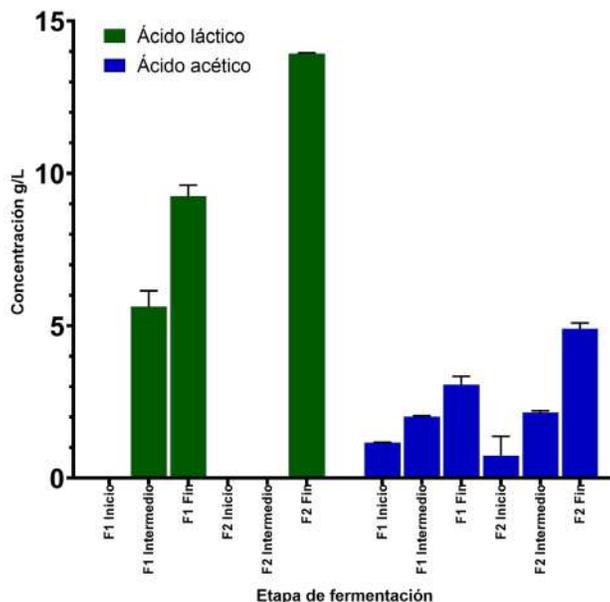


Figura 5. Concentración de ácidos orgánicos (láctico y acético) generados en las fermentaciones F1 y F2

Con los resultados obtenidos se procedió a realizar un análisis estadístico con el software XLSTAT 2022. Ver. 2. 2 (Addinsoft, New York, USA). Se llevó a cabo un análisis de componentes principales para evaluar el efecto de los compuestos volátiles, los ácidos orgánicos generados y los microorganismos identificados durante la fermentación. La Figura 6 presenta los dos primeros componentes principales (C1 y C2) que explicaron conjuntamente el 80.20% de la varianza total. El análisis permitió agrupar según el tiempo de fermentación, separando las muestras correspondientes a las etapas de inicio e intermedio de fermentación de la etapa final de fermentación. Las etapas de inicio e intermedia se caracterizaron porque en este cuadrante se encuentran la mayoría de los compuestos orgánicos como ácido succínico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido málico y ácido propiónico asociados a las bacterias *Leuconostoc* y *Weissella*; este grupo de muestras también está asociado a las levaduras *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Torulas-*

pora. Dentro del grupo correspondiente a la etapa final de fermentación observamos cómo se asocian todos los ésteres, tales como lactato de etilo, acetato de etilo, acetato de isoamilo, propionato de etilo, hexanoato de etilo y decanoato de etilo; así mismo, vemos que los microorganismos asociados a este grupo son *Hanseniaspora*, *Citeromyces*, *Wickerhamomyces* y *Saccharomyces*. En esta etapa de fermentación también observamos la asociación de ácido láctico y ácido acético, destacando la presencia de *Lactobacillus* y *Acetobacter* en este mismo grupo.

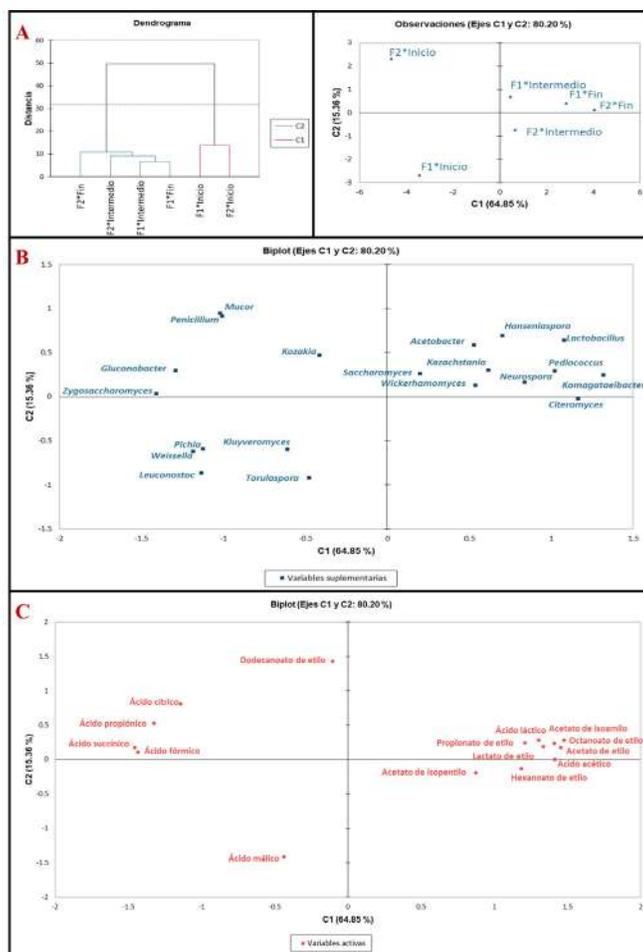


Figura 6. Análisis de componentes principales. A) Gráfico de agrupación por fase de fermentación. B) Gráfico de compuestos volátiles y ácidos orgánicos. C) Gráfico de microorganismos identificados durante la fermentación.

Conclusiones

Como se puede observar, estos procesos artesanales son muy complejos, aunque la destilería presente sus procesos bien definidos. Sin embargo, se observan muchas variaciones y eficiencias de fermentación relativamente bajas. Los géneros *Hanseniaspora* y *Lactobacillus* son los predominantes al final de las fermentaciones, ya que están presentes al inicio y aumentan conforme la fermentación avanza.

El lactato de etilo y el acetato de etilo son los ésteres presentes con mayor abundancia en todas las fermentaciones, incluso comparadas contra otros reportes de jugo de agave utilizado para la elaboración de mezcal. La producción de lactato de etilo está relacionada con la generación de ácido láctico en cada fermentación, mientras que este comportamiento no se observa en la generación otros ésteres como son propionato de etilo y acetato de isoamilo en este mismo trabajo.

Estos resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa en el análisis metagenómico y de los compuestos volátiles generados en fermentaciones con diferentes tipos de agave, pero es necesario analizar más fermentaciones para corroborar estos resultados.

Referencias

- Arellano, M., Gschaedler, A., & Alcázar, M. (2012). Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-HS). En Salih, B., & Celikbicak, O. (eds.), *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications*, 73-88.
- Arellano Plaza, M., Paez-Lerma, J. B., Soto-Cruz, N. O., Kirchmayr, M. R., & Gschaedler Mathis, A. (2022). Mezcal Production in Mexico: Between Tradition and Commercial Exploitation [Review]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.832532>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., & Asnicar, F. (2019). Reproducible, interactive, scalable and

- extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583.
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L., & De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 626-630. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02359.x>
- Jacques-Hernández, C., Soto-Cruz, O. N., Rutiaga, M., & Sifuentes-Rincón, A. M. (2009). *Ecología de levaduras del mezcal San Carlos, Tamaulipas*. Resumen en las memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposium Internacional de producción de alcoholes y levaduras. Acapulco, México,
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Flores-Berrios, E. P., & Gschaedler, A. (2011). Strategy for the extraction of yeast DNA from artisan agave must for quantitative PCR analysis. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112(5), 518-521. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.07.009>
- Kirchmayr, M. R., Segura García, L. E., Lappe Oliveras, P., Moreno Terrazas, R., De la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68(2), 151-160.
- Lappe Oliveras, P., Moreno Terrazas, R., Arrizón Gaviño, J., Herrera Suárez, T., García Mendoza, A., & Gschaedler Mathis, A. (2008).

- Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non-distilled and distilled Agave beverages. *FEMS yeast research*, 8(7), 1037-1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Liu, S., Laaksonen, O., & Yang, B. (2019). Volatile composition of bilberry wines fermented with non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts in pure, sequential and simultaneous inoculations. *Food microbiology*, 80, 25-39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.015>
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8228-8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Martell Nevárez, M. A., Páez Lerma, J. B., López Miranda, J., Soto, N. O., Cruz, R. R. H., & Rutiaga Quiñones, O. M. (2009). *Identificación de levaduras nativas aisladas de la producción de mezcal por análisis de RFLPs del gen 18S*. Resumen en las memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Accessed November, Medina Valtierra, G., Juárez Ciprés, R., & Peña Álvarez, A. (2011). Identification and Quantification of Aldehydes in Mezcal by Solid Phase Microextraction with On-fiber Derivatization-Gas Chromatography. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(2), 84-88.
- Narvaez-Zapata, J. A., Rojas-Herrera, R., Rodríguez-Luna, I., & Larralde-Corona, C. P. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. *Current microbiology*, 61(5), 444-450.
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., & Tedersoo, L. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259-D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- NOM-070-SCFI. (2016). *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017#gsc.tab=0
- Papalexandratou, Z., Kaasik, K., Kauffmann, L. V., Skorstengaard, A., Bouillon, G., Espensen, J. L., Hansen, L. H., Jakobsen, R.

- R., Blennow, A., & Krych, L. (2019). Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. *International Journal of Food Microbiology*, 304, 106-118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.012>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS one*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Robeson, M. S., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2020). *RES-CRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses*. bioRxiv, 2020.2010.2005.326504. <https://doi.org/10.1101/2020.10.05.326504>
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D., & Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, 241, 126593. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126593>
- Vera Guzmán, A. M., López, M. G., & Chávez-Servia, J. L. (2012). Chemical composition and volatile compounds in the artisanal fermentation of mezcal in Oaxaca, Mexico. *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14344-14353. <https://doi.org/10.5897/AJB111.963>
- Villarreal-Morales, S. L., Montañez-Saenz, J. C., Aguilar-González, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2018). Metagenomics of traditional beverages. En A. Mihai-Grumezescu & A. Holba (eds.), *Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 301-326). Elsevier.

2.4 CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DEL MEZCAL: DESDE LOS AROMAS HASTA LAS PREFERENCIAS

Sergio Erick García Barrón^{1*}

RESUMEN

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, su zona de producción abarca una parte importante del territorio nacional, lo que le brinda una identidad sensorial ligada a la región en donde se produce. Para verificar esta idea se estableció una estrategia metodológica que incluía dos etapas: una metodología sensorial y otra instrumental. A nivel sensorial se observó que existían diferencias entre lotes de un mismo fabricante y que cada mezcal tenía un perfil sensorial diferente. A nivel instrumental, cada producto tuvo un perfil de compuestos volátiles diferentes indicando que el proceso de fermentación influye en la composición. Por otro lado, como parte de las investigaciones con el mezcal se planteó la pregunta ¿La preferencia y percepción de los consumidores por el mezcal se relaciona con el lugar de residencia? Los resultados muestran que existe una relación entre el lugar de origen de los consumidores y sus preferencias, ya que se tiende a preferir los productos elaborados en sus lugares de origen, demostrando que la familiaridad guía las preferencias de los consumidores, así mismo, la información tiende a acentuar estas preferencias. Como parte de estos estudios también se planteó investigar cómo los consumidores definen el concepto “mezcal”, observando que la familiaridad de los consumidores para con el producto tenía una relación con el tipo y número de palabras empleadas para la definición del “mezcal”.

PALABRAS CLAVE: Agave, Maguey, Evaluación sensorial, Consumidores, Productos tradicionales.

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, Biotecnología Industrial, Camino Arenero 1227, El Bajío, Cp. 45019, Zapopan Jal. *segarcia@ciatej.mx

Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica mexicana obtenida de la fermentación y destilación del jugo de agave cocido (De León-Rodríguez *et al.*, 2006), cuenta con una Zona de Denominación de Origen que hasta el momento comprende 9 estados del país, (COMERCAM, 2022), no solo por la especie de agave con la que se elabora, sino por el proceso que se emplea para elaborarlo (materiales, herramientas, microorganismos, tiempos y temperaturas), lo que se traduce en una vasta diversidad de características sensoriales ligadas a cada región (Illsley *et al.*, 2009). Lo anterior se ve reflejado en aspectos simbólicos que resaltan su importancia cultural y social, además de la importancia económica para las zonas en donde se produce. En el tema científico, desde hace poco más de 15 años se han llevado a cabo investigaciones orientadas al estudio y caracterización de la composición (De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Vera-Guzmán *et al.*, 2018), determinación de patrones de autenticidad (Ceballos-Magana *et al.*, 2009; Peña-Alvarez *et al.*, 2006), caracterización de las fermentaciones y flora microbiana (Kirchmayr *et al.*, 2017; Verdugo Valdez *et al.*, 2011) y estudio y caracterización de la materia prima (Félix-Valdez *et al.*, 2016; Lara-Ávila & Alpuche-Solís, 2016; Vega-Ramos *et al.*, 2022). Por otro lado, la exploración de las características sensoriales y el nivel de agrado de representación conceptual ha sido poco estudiado. En ese sentido, en este capítulo se aborda el trabajo realizado en CIATEJ sobre la caracterización sensorial del producto final y aspectos relacionados con las preferencias y conceptos relacionados con el mezcal.

Resultados y discusión

Perfil aromático y su relación con el proceso

La gran mayoría del mezcal se elabora bajo condiciones artesanales (Molina-Guerrero *et al.*, 2007) y, propiamente, no se conoce el efecto de las etapas del proceso de elaboración del mezcal. La etapa de fermentación puede definirse como el proceso de mayor impor-

tancia, ya que la mayoría de los compuestos volátiles responsables de las características sensoriales se producen en esta etapa, además, las fermentaciones variables pueden contribuir a un perfil aromático variable. Ante esta situación, se planteó un macroproyecto denominado “Biomezcal”, cuyo objetivo fue la caracterización y estudio de las condiciones de fermentación y especialmente de la flora microbiana de los procesos fermentativos empleados en mezcaleras de Oaxaca y San Luis Potosí. Como principal resultado de este proyecto se obtuvo la identificación de 27 especies de levaduras de 18 géneros distintos, algunas de ellas comunes entre fabricantes y otros se consideraron diferenciadores (Kirchmayr *et al.*, 2017). Ante estas observaciones se planteó la siguiente pregunta: ¿Existirá diferencia en el perfil de compuestos volátiles que se generan bajo las diferentes condiciones y floras? Para responder esta cuestión se estableció una metodología que involucraba el uso de metodologías instrumentales y sensoriales que, mediante el uso de herramientas estadísticas, se pudieran correlacionar y de esta manera poder establecer cuantitativamente la relación entre ambas mediciones.

En la Tabla 1 se muestran las condiciones de fermentación, así como las zonas de procedencia de los mezcales estudiados. Es importante mencionar que todos los mezcales se estandarizaron a una concentración de 38% V/V, con el fin de homogenizar el contenido alcohólico.

Tabla 1. Características de los mezcales analizados

Mezcal	Lote	Tipo de fermentación	Región
Mezcal 1	2008 (Lote 1)	Jugo con bagazo, en tinas de madera, fermentación espontánea, alta población de bacterias	Matatlán, Oaxaca
Mezcal 2	2008 (Lote 1)	Jugo con bagazo, tinas de madera, fermentación espontánea	San Pedro Totolapan, Oaxaca
Mezcal 3	2009 (Lote 2)	Jugo con bagazo, tinas de madera, fermentación inducida	Matatlán, Oaxaca
Mezcal 4	2008 (Lote 2)	Jugo con bagazo, fermentación inducida, sulfato de amonio	San Pedro Totolapan, Oaxaca
Mezcal 5 (M5)	2007	Jugo sin bagazo, tinas de madera, fermentación inducida, sulfato de amonio	San Luis Potosí

Como parte de las mediciones sensoriales, se generaron 20 descriptores de olor, para ello se emplearon referencias externas que los jueces asimilaban los términos, de tal manera que fuera posible generar los perfiles sensoriales de cada mezcal. La información generada por los jueces entrenados fue analizada mediante un análisis de componentes principales (Figura 1).

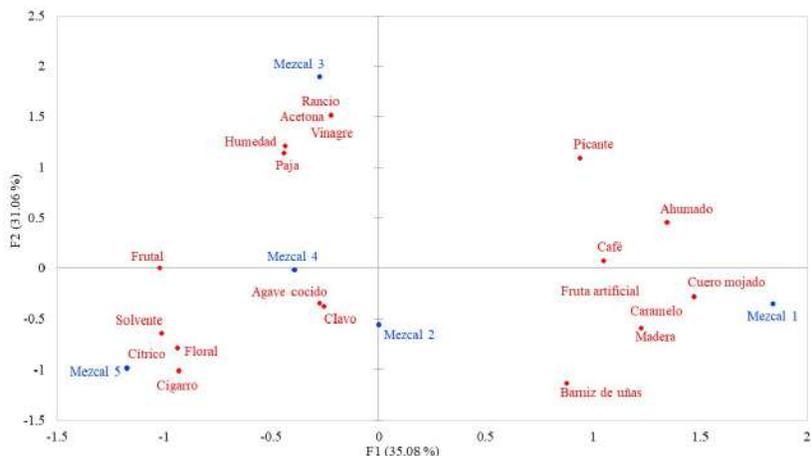


Figura 1. Análisis de componentes principales sobre las intensidades de los descriptores del perfil de olor de los mezcals analizados

Los resultados mostraron que existían diferencias entre las regiones de procedencia del mezcal a nivel sensorial. Así mismo, se observó que cada mezcal se distingue por un patrón de descriptores sensoriales, lo cual les brinda identidad sensorial, como lo confirman los perfiles sensoriales de cada uno de los mezcals (Figura 2).

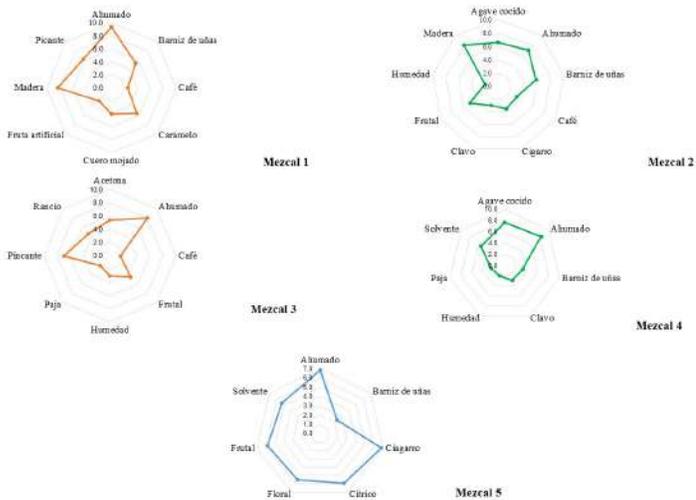


Figura 2. Perfil descriptivo de olor de los cinco lotes de mezcales de diferentes regiones

Posteriormente, mediante el proceso de microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés) se extrajeron y concentraron los compuestos volátiles en fase gaseosa y fueron identificados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Los datos fueron analizados mediante análisis de componentes principales (Figura 3).

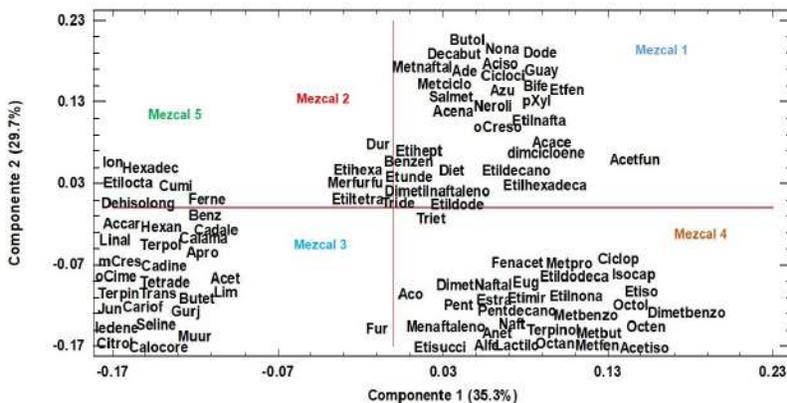


Figura 3. Análisis de componentes principales sobre los compuestos identificados en los cinco mezcales

Los resultados mostraron que, a nivel de composición, existían diferencias entre mezcales, incluso entre mezcales del mismo fabricante, lo que confirma lo observado en los perfiles sensoriales. El mezcal de San Luis Potosí (Mezcal cinco) presentó una mayor cantidad de compuestos terpénicos como limoneno o linalol. En el caso de los mezcales de Oaxaca, tuvieron una mayor presencia de ésteres como el acetato de etilo, acetato de isoamilo o decanoato de etilo. Globalmente, los compuestos volátiles se agruparon en función del mezcal, lo que sugiere un efecto de la región de procedencia y en consecuencia de las condiciones de fermentación.

Correlación de mediciones sensoriales e instrumentales

Una vez realizadas tanto las mediciones sensoriales como instrumentales, se empleó la técnica de Mínimos cuadrados parciales (PLS por sus siglas en inglés) (Vilanova *et al.*, 2010). Para llevar a cabo el análisis, se consideraron las concentraciones de los compuestos cuantificados en la fase gaseosa como matriz predictiva (X) contra los datos de intensidad de los descriptores de olor de los perfiles de los mezcales que fueron diferenciadores de lote y del productor como matriz de respuesta (Y). Los resultados de las mediciones instrumentales y sensoriales fueron correlacionados mediante la técnica de mínimos cuadrados parciales, mostrando una correlación entre los descriptores diferenciadores y los compuestos cuantificados (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de mínimos cuadrados parciales realizado sobre los descriptores diferenciadores de los mezcales de estudio y los compuestos volátiles

Matriz predictiva	Descriptor	Regresión R ²	Número de componentes	Valor P	Mezcales
Concentración de los 10 compuestos volátiles	Acetona	0.9053	6	0.00020	M3
	Agave cocido	0.4911	7	0.0009	M2, M4
	Caramelo	0.9945	9	0	M1
	Cítrico	0.723	5	0.0047	M5
	Clavo	0.9854	6	0.00016	M2, M4
	Cuero mojado	0.9959	9	0	M1
	Floral	0.9931	5	0.0005	M5
	Frutas artificiales	0.9946	3	0.00036	M1
	Picante	0.7274	4	0.00110	M1, M3
	Rancio	0.9281	4	0.0076	M3
Vinagre	0.8877	6	0.00131	M3	

Los resultados muestran que la mayoría de los descriptores presentaron coeficientes de regresión altos; es decir, los compuestos volátiles predicen a cada uno de los descriptores diferenciadores. Una de las hipótesis que se plantearon al inicio de este trabajo fue que sólo los descriptores diferenciadores contribuirían al olor característico de cada mezcal y por ello los mezcales podrían ser diferenciados. La Figura 4 muestra los pesos de los componentes para algunos de los descriptores diferenciadores.

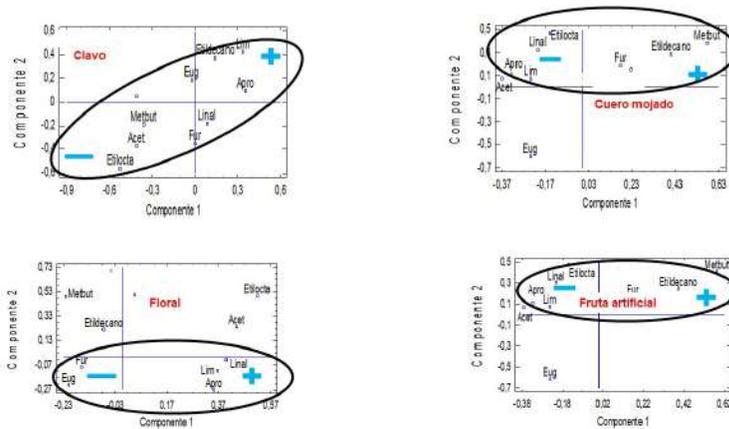


Figura 4. Pesos de los componentes para algunos de los descriptores sensoriales del mezcal

Los descriptores diferenciadores presentaron una alta correlación con los compuestos volátiles. La correlación entre descriptores y compuestos volátiles sugiere que la generación de un descriptor sensorial es debida a la presencia de un patrón de compuestos volátiles que contribuyen, en conjunto, a la formación de un descriptor sensorial.

Pruebas con consumidores

Si bien es cierto que hasta este punto el número de estudios sobre el mezcal ya habían aumentado, la información sobre la percepción y nivel de agrado era escasa. En ese sentido, Pedrero (2007) había orientado a medir el nivel de agrado e imagen conceptual del mezcal del estado de Guerrero entre consumidores de bebidas alcohólicas con edades entre los 30 y 40 años, específicamente de la Ciudad de México. De acuerdo con sus resultados, el mezcal puede ser aceptado por sus características sensoriales. Además, sus resultados revelaron que el mezcal es diferente del tequila, así mismo, se asocia lo artesanal a aspectos ligados al campo, a la presencia del gusano, al barro, arcilla y madera. A pesar de los resultados, el estudio sólo consideró una región del país y un segmento

de consumidores limitado. Ante esta situación, se planteó un trabajo de investigación en donde se abordaron algunos factores responsables de las diferencias en la conceptualización y nivel de agrado del mezcal, tomando en cuenta tanto el origen del mezcal como el origen de los consumidores. Para ello se consideraron cuatro ciudades de México, tomando en cuenta la familiaridad y exposición. La información obtenida puede contribuir a la comprensión de factores que influyen en el concepto de esta bebida y, por otro lado, aportar al sector metodología científica y confiable para medir la postura del consumidor.

Evaluación de un producto regional en diferentes mercados

Para conocer cómo se valora un producto con las características del mezcal, se evaluó el nivel de agrado en cuatro diferentes ciudades de México: Ciudad de México, Durango, Guadalajara y Oaxaca capital. En cada ciudad participaron 100 consumidores. Se evaluó el nivel de agrado de nueve diferentes mezcales, cuya información se muestra en la Tabla 3. Las comparaciones de los valores entre ciudades mostraron diferencias significativas a excepción del mezcal San Dionisio (Tabla 4).

Tabla 3. Características de los mezcales evaluados

Mezcales	Contenido alcohólico (V/V)	Método de producción	Lote	Región de Origen
San Dionisio	46%	Artesanal	AMO- JO/290512	San Dionisio, Oax.
Matatlán Am	37%	Artesanal	1-1214- 2012	Santiago Matatlán, Oax.
Oaxaca Be	38%	Industrial	001-OAX	Oaxaca de Juárez, Oax.
Matatlán Dan	45.2%	Artesanal	T-007	Santiago Matatlán, Oax.
Durango LD	38%	Semi-industrial	618-810- LD	Dolores Hidalgo, Dgo.
San Luis	50.9%	Artesanal	SI/06/12	San Luis, Oax.
San Andrés	47.5%	Artesanal	SAM005/11	San Andrés Mihuatlán, Oax.
San Baltazar	47.4%	Artesanal	SBG001/12	San Baltazar Guelavia, Oax.
San Juan	48.9%	Artesanal	SJR006/11	San Juan del Río, Oax.

Los consumidores de Durango apreciaron significativamente más los productos Oaxaca Be y Durango LD. Los participantes de Guadalajara apreciaron los productos Matatlán Am y San Dionisio. Cabe mencionar que el mezcal Matatlán Am presentó el contenido de alcohol más bajo (37 % V/V), mientras que San Dionisio tuvo un contenido relativamente alto (46 % V/V).

Tabla 4. Valores medios del nivel de agrado por producto y ciudad

Producto	Durango	Guadalajara	Ciudad de México	Oaxaca
San Dionisio	5.39	5.34	5.81	5.90
Matatlán Am	4.94 AB	5.60 A	5.05 AB	4.37 B
Oaxaca Be	5.70 AB	5.1 AB	5.75 A	4.77 B
Matatlán Dan	4.44 B	3.58 C	4.98 AB	5.50 A
Durango LD	5.60 A	4.57 B	4.81 B	4.57 B
San Luis	4.35 B	5.02 AB	5.12 AB	5.42 A
San Andrés	5.24 A	4.38 B	5.31 A	5.55 A
San Baltazar	5.30 A	4.28 B	5.22 A	5.10 AB
San Juan	4.50 AB	4.15 B	4.56 AB	5.00 A

A-B: Valores medias en el mismo renglón con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la Ciudad de México los participantes prefirieron, principalmente, los productos San Dionisio y Oaxaca Be. Ambos mezcales se diferencian tanto en el proceso de elaboración como en el grado alcohólico, ya que el San Dionisio se elabora mediante un proceso artesanal; Oaxaca Be, bajo un proceso industrializado. Finalmente, los consumidores de Oaxaca prefirieron el mezcal San Dionisio.

Posteriormente, para explicar los resultados del nivel de agrado se realizó un mapeo externo de preferencias (Figuras 5 y 6). El análisis muestra que los consumidores son capaces de diferenciar las muestras, incluso aquellos que los participantes aparentemente no conocen, como son los participantes de Guadalajara.

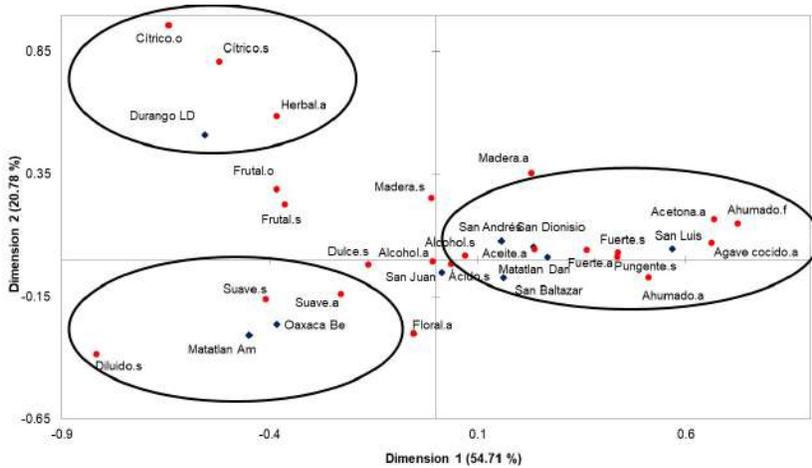


Figura 5. Mapeo externo de preferencias: posición de los productos y atributos

Los consumidores de Durango tendieron a preferir el producto local, al igual que el Bemezcal de Oaxaca. En cuanto a Guadalajara, los consumidores tienden a preferir el Mezcal Matatlán Am, el cual tiene una concentración similar al tequila. Sorprendentemente, en esta ciudad los consumidores valoraron significativamente el mezcal San Dionisio, un producto con un grado alcohólico relativamente alto, el cual se caracterizó por notas como sabor ahumado y aromas a agave ahumado y cocido. Una posible explicación para este resultado, en particular, podría ser el concepto del “principio de sabor” descrito por Rozin & Rozin (1981). Este concepto indica que dentro de cada cultura existen sabores preferidos, los cuales son el resultado del uso y combinación de ciertos ingredientes dentro de cada cultura.

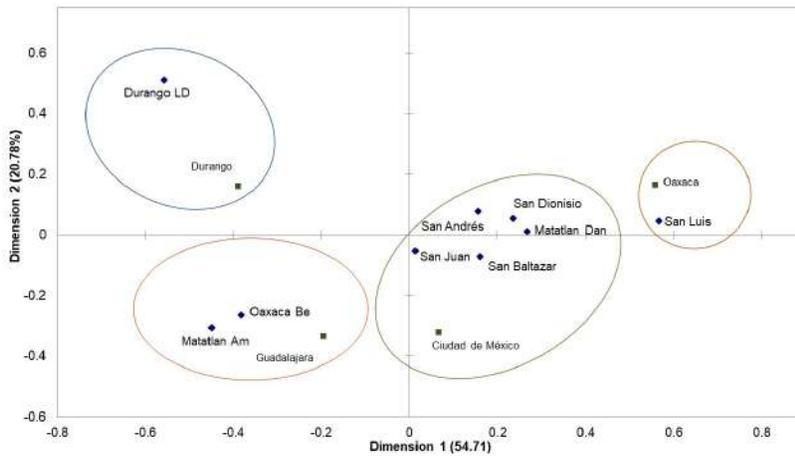


Figura 6. Mapeo externo de preferencias del mezcal: posición de los productos y ciudades

Los mezcales de mayor preferencia en la Ciudad de México fueron percibidos de manera diferente. El mezcal Oaxaca Be se describió como de aroma suave y herbal. En el caso de San Dionisio, se describió como picante y ahumado de aroma a agave cocido. Por otro lado, en el caso de los participantes de Oaxaca, la familiaridad con el producto parece explicar sus preferencias, ya que el producto más apreciado fue el producido localmente, con alta concentración de alcohol y, además, el producto presentaba el aroma del agave cocido, que es característico del proceso de cocción con leña, llevado a cabo de manera artesanal. Algunos autores han señalado que en cada lugar existen productos “ideales”, que tienen características o atributos que encajan mejor con los valores normativos establecidos para cada cultura (Devine *et al.*, 1999; Sobal *et al.*, 2006), de manera similar a lo que parece suceder en el presente estudio. Estos resultados podrían deberse a la familiaridad con el producto, ya que es uno de los factores que contribuye a la conformación del comportamiento relacionado con dicho producto, que a su vez parece conformar las preferencias individuales (Guerrero *et al.*, 2012).

Representación del concepto “mezcal”

Aun cuando la población de un país comparte una cultura de manera general, existen rasgos que diferencian a las regiones dentro de ese país. Dichos rasgos se reflejan en el comportamiento, prácticas y hábitos de consumo, un ejemplo puede ser la representación de un concepto de interés, en este caso “mezcal”. Para ello se empleó una técnica proyectiva como la asociación de palabras (Gambaro, 2018). Mediante dicha técnica se analizó el patrón de palabras en función de cuatro ciudades (Ciudad de México, Durango, Guadalajara y Oaxaca) y a través de herramientas de estadística multivariada se mostraron las diferencias debidas a la ciudad. Derivado del análisis, se retuvieron las 20 palabras mayormente mencionadas. Mediante la prueba exacta de Fisher se observaron diferencias significativas en 16 palabras (Tabla 5). Se observó que las palabras que se mencionaron con mayor frecuencia fueron: fuerte, agave y artesanal. Para Ciudad de México, las palabras que se mencionaron con mayor frecuencia fueron: alcohol, estado, fuerte y quemante; en Durango: alcohol, barato, borrachera, borracho, cruda y fuerte; para Guadalajara fueron: alcohol y fuerte; en el caso de Oaxaca, las palabras fueron: agradable, ahumado, artesanal, comida, cultura, naranja, tradición y variedad. Guerrero *et al.* (2000) mencionan que la frecuencia de mención refleja la importancia de un concepto en la mente de los consumidores, por lo que las palabras más mencionadas pudieran conformar la base de la definición global del término mezcal (fuerte, agave y artesanal).

Tabla 5. Comparación de las frecuencias de citación de las palabras más asociadas al mezcal por campo social

Palabra	Durango	Guadalajara	Ciudad de México	Oaxaca	Frecuencia global	valor-p
Agave	24	24	26	29	103	n.s.
Agradable	11	2	15	19	47	0.0172
Ahumado	0	16	12	21	49	0.0005
Alcohol	24	20	21	4	69	0.0005
Artesanal	12	28	19	44	103	0.0005
Barato	20	14	18	2	54	0.0007
Borrachera	12	10	0	6	28	0.0017

Caracterización sensorial del mezcal: desde los aromas hasta las preferencias

Borracho	17	8	0	4	29	0.000
Comida	4	4	8	24	40	0.0001
Cruda	18	11	3	5	37	0.0002
Cultura	2	7	8	20	37	0.0019
Estado	21	4	40	3	68	0.000
Fiesta	9	15	5	9	38	n.s.
Fuerte	58	45	56	34	193	0.0078
Gusano	6	5	12	17	40	n.s.
Magüey	10	14	26	23	73	n.s.
Naranja	0	2	4	12	18	0.0016
Quemante	12	12	22	3	49	0.0028
Tradición	7	22	21	25	75	0.0393
Variedad	1	3	4	22	30	0.000

*Las comparaciones son entre campo social; se utilizó la prueba exacta de Fisher, $p < 0.05$ y los valores significativos se marcan en negritas.

Para poder comparar las diferencias entre ciudades y palabras asociadas se utilizó un análisis factorial de correspondencia (Figura 7). Los resultados mostraron que cada ciudad tuvo un grupo de palabras, lo cual confirma que la representación del concepto “mezcal” es diferente en función de la ciudad y que aun cuando se trate del mismo país, existen diferencias asociadas, en este caso, a la definición de un producto como el mezcal.

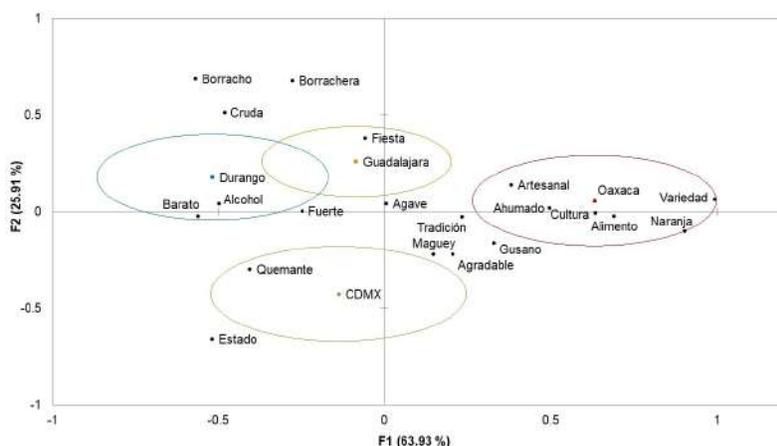


Figura 7. Análisis factorial de correspondencia sobre las palabras asociadas al mezcal en cada ciudad

Las palabras que los consumidores de Oaxaca asociaron al mezcal fueron: ahumado, alimento, artesanal, comida, cultura, naranja y variedad. En el caso de Durango, las palabras asociadas al mezcal fueron borrachera, borracho, barato y cruda. Los consumidores de la Ciudad de México asociaron con mayor frecuencia al mezcal con las palabras estado, maguey y quemante. Finalmente, los consumidores de Guadalajara relacionaron al mezcal, principalmente, con las palabras fiesta, tradición y ahumado. De acuerdo con lo observado en este estudio, el mezcal se puede definir como una bebida artesanal fuerte que se elabora de agave y que aun cuando se trata del mismo país, la representación está en función de la ciudad, por lo que es necesario tenerlo en cuenta cuando se busca comunicar o difundir a un producto.

Conclusiones

Este capítulo hace una recapitulación del trabajo de investigación sobre el mezcal a lo largo de los últimos 13 años, en donde se ha mostrado un avance en la generación de conocimiento desde la perspectiva de la evaluación sensorial y ciencia del consumidor. Sin embargo, aún hay camino por recorrer en estas áreas del conocimiento. Sin duda el abordaje de los factores responsables de la percepción y preferencias puede ayudar a los pequeños productores de mezcal para generar e implementar estrategias y políticas públicas encaminadas a una producción sustentable y un consumo reflexivo, en donde las características sensoriales son fundamentales ya que son el reflejo del proceso de elaboración tradicional, lo cual es fundamental para la preservación de la percepción de la imagen del producto desde la perspectiva del consumidor.

Referencias

- Ceballos-Magana, S. G., Jurado, J. M., Martín, M. J., & Pablos, F. (2009). Quantitation of twelve metals in tequila and mezcal spirits as authenticity parameters. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1372–1376. <https://doi.org/10.1021/jf803626k>
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. (2022). *Informe estadístico 2022*. <https://comercam-dom.org.mx/estadisticas/>
- De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., Barba de la Rosa, A. P., Escalante-Minakata, P., & López, M. G. (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(4), 1337–1341. <https://doi.org/10.1021/jf052154+>
- Devine, C. M., Wolfe, W. S., Frongillo Jr, E. A., & Bisogni, C. A. (1999). Life-course events and experiences: Association with fruit and vegetable consumption in 3 ethnic groups. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(3), 309–314. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00080-2)
- Félix-Valdez, L. I., Vargas-Ponce, O., Cabrera-Toledo, D., Casas, A., Cibrian-Jaramillo, A., & de la Cruz-Larios, L. (2016). Effects of traditional management for mescal production on the diversity and genetic structure of *Agave potatorum* (Asparagaceae) in central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63, 1255–1271.
- Gambaro, A. (2018). Projective techniques to study consumer perception of food. *Current Opinion in Food Science*, 21, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.004>
- Gurrero, L., Claret, A., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Enderli, G., Sulmont-Rossé, C., Hersleth, M., & Guàrdia, M. D. (2012). Cross-cultural conceptualization of the words Traditional and Innovation in a food context by means of sorting task and hedonic evaluation. *Food Quality and Preference*, 25(1), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.01.008>
- Gurrero, L., Colomer, Y., Guàrdia, M. D., Xicola, J., & Clotet, R. (2000). Consumer attitude towards store brands. *Food Quality and Preference*, 11(5), 387–395. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(00\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(00)00012-4)

- Illsley, G. C., Giovannucci, D., & Bautista, C. (2009). *La dinámica territorial de la zona mezcalera de Oaxaca entre la cultura y el comercio*. Grupo de Estudios Ambientales AC.
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Mathis, A. G. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Lara-Ávila, J. P., & Alpuche-Solís, Á. G. (2016). Análisis de la diversidad genética de agaves mezcaleros del centro de México. *Revista fitotecnía mexicana*, 39(3), 323–330.
- Molina-Guerrero, J. A., Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J. L., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M., & Rico-Martínez, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41–50.
- Pedrero, D. (2007). *Descripción sensorial del mezcal de Guerrero*. Research report. Penta sensorial S.A de C.V. <https://www.pentasensorial.com.mx/>
- Peña-Alvarez, A., Capella, S., Juárez, R., & Labastida, C. (2006). Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1134(1–2), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.005>
- Rozin, E., & Rozin, P. (1981). Culinary themes and variations. *The taste culture reader: Experiencing food and drink*, 6(14), 34–41.
- Sobal, J., Bisogni, C. A., Devine, C. M., & Jastran, M. (2006). A conceptual model of the food choice process over the life course. En R. Shepherd & M. Raats (eds.), *The psychology of food choice* (pp. 1–18). Cabi Wallingford UK.
- Vega-Ramos, K. L., Gutierrez-Coronado, M. A., & Gómez-Leyva, J. F. (2022). Marcadores moleculares ISSR para identificación de hijuelos de agaves. *Revista Fitotecnía Mexicana*, 45(1), 75–75.
- Vera-Guzmán, A. M., Guzmán-Gerónimo, R. I., López, M. G., & Chávez-Servia, J. L. (2018). Volatile compound profiles in mezcal

- spirits as influenced by agave species and production processes. *Beverages*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.3390/beverages4010009>
- Verdugo Valdez, A., Segura Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramírez Rodríguez, P., González Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 497–506. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-011-9605-y>
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Masa, A., & Oliveira, J. M. (2010). Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal*, 95(2), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.12.007>

2.5 HUELLA ESPECTRAL DE BEBIDAS DESTILADAS DE AGAVE MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Diana N. Regla Corona¹, Pedro M. Mondragón Cortez¹ y
Julisa E. López Ramírez^{1*}

RESUMEN

A través de la técnica de espectroscopia de infrarrojo fueron encontrados marcadores espectrales, los cuales podrían permitir de forma rápida y confiable la diferenciación entre las distintas bebidas destiladas mexicanas analizadas (tequila, mezcal, cacanora y sotol). Los espectros de las diferentes bebidas básicamente presentan las mismas bandas, asociadas con su contenido de alcohol y agua. Sin embargo, cuando las muestras fueron evaporadas en el accesorio del espectrómetro (ATR), en el espectro encontrado se lograron identificar bandas de absorción que podrían diferenciar a los tipos de bebidas investigadas. La región del espectro de infrarrojo comprendida entre 1300 y 800 cm^{-1} fue la que contribuyó de mejor manera en la diferenciación entre las muestras analizadas.

PALABRAS CLAVE: Bebidas alcohólicas, agave, tequila, mezcal, espectroscopia, infrarrojo.

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Tecnología Alimentaria, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jal., México 45019. * jelopez@ciatej.mx

Introducción

En México se producen diversas bebidas destiladas de carácter tradicional, diferenciadas entre sí por la materia prima utilizada, el proceso de elaboración, la región de producción, así como los usos y costumbres que las rodean. Las Normas Oficiales Mexicanas (NOMs) 006-SCFI, 168-SCFI y 159-SCFI establecen una sola especie de materia prima para: tequila (*A. tequilana* Weber), cacahora (*A. Angustifolia* Haw) y sotol (*Dasyliirion* spp.), mientras que la NOM-070-SCFI para el mezcal establece alrededor de 14 especies que pueden usarse como materia prima.

Las bebidas destiladas se vinculan a la zona geográfica de la que son originarias sus materias primas, las cuales están reconocidas en la Denominación de Origen correspondiente. El tequila en el estado de Jalisco, algunos municipios de Guanajuato, Nayarit y Tamaulipas. El mezcal en los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zatecas y Durango, algunos municipios de Guanajuato, Tamaulipas, Michoacán, Puebla, Estado de México, Aguascalientes, Morelos y Sinaloa. El bacahora en el estado de Sonora y el sotol en los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango. Se puede apreciar la distinción por estados en un mapa de la república mexicana en la figura 1 (NOM-006-SCFI; NOM-070-SCFI; NOM-168-SFCI; NOM-159-SCFI).



Figura 1. Zonas geográficas reconocidas en la denominación de origen por producto bacahora (B), sotol (S), tequila (T) y mezcal (M)

Las bebidas destiladas de agave llevan un proceso de elaboración que involucra la obtención de los jugos del agave, la hidrólisis, la molienda, la fermentación y la destilación para la obtención del producto blanco, el cual puede llevarse a maduración para la obtención de productos reposados, añejos y extra añejos (como se puede observar en la Figura 2), para finalizar con un acabado especial establecido por cada empresa productora antes del envasado.

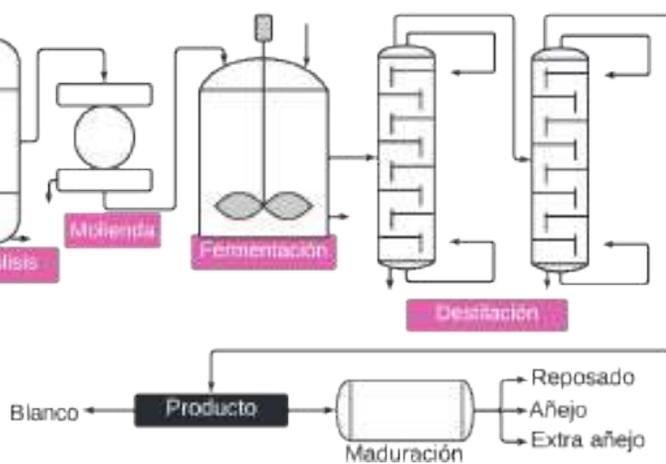


Figura 2. Principales operaciones unitarias del proceso de elaboración de bebidas destiladas de agave

Estas diferencias en la materia prima y en el proceso de producción generan distintos perfiles composicionales (CRT, 2022; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). El sabor, el olor y el aroma de los destilados están determinados por una gran diversidad de compuestos. Los compuestos volátiles o semi volátiles influyen, principalmente, en el olor y el aroma característico de estos productos. Mientras que los compuestos no volátiles determinan principalmente el sabor, característica que influye en la decisión de consumo (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

Una técnica empleada para evaluar los compuestos no volátiles en las muestras de destilados es la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). El resultado que se obtiene del análisis por espectroscopia de infrarrojo es un espectro de infrarrojo de la muestra

respectiva analizada. Un espectro es una secuencia de bandas o picos de absorción en un intervalo de frecuencias dentro del infrarrojo. Cada pico o banda en el espectro representa un tipo de vibración que ocurrió en un enlace atómico determinado, cuando interaccionó el haz de infrarrojo con dicha muestra, como se puede observar en la Figura 3.

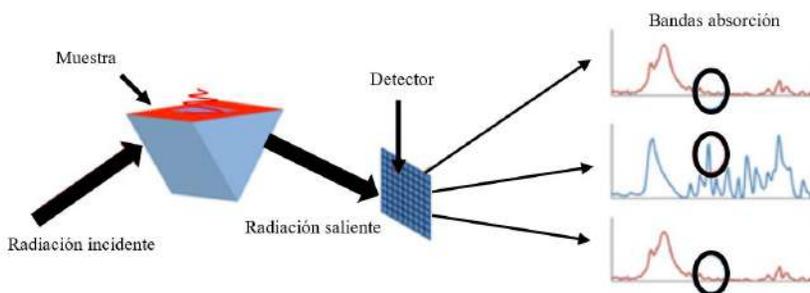


Figura 3. Descripción grafica del análisis por espectroscopia de infrarrojo.
Tomado de Mondragón (2020)

Estos diferentes tipos de interacción dependerán, principalmente, de las características físicas y químicas de la muestra, así como de la intensidad de la radiación utilizada. Los alimentos en estado líquido o semilíquido presentan un espectro de FTIR influenciado por el solvente, por ejemplo, debido al agua o en el etanol presente en las bebidas alcohólicas. La influencia de este tipo de solventes en muchos casos puede enmascarar todo rastro de otros compuestos (a menudo en bajas concentraciones) presentes en una muestra o dificultar la identificación de sus picos de absorción. Para el caso de una bebida alcohólica, en este caso tequila, su espectro de FTIR prácticamente es una combinación de bandas de absorción generadas por la presencia de agua y etanol presentes en la muestra. El objetivo del trabajo es la obtención de perfiles espectrales mediante la implementación de la técnica de FTIR en combinación con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) para la búsqueda de posibles marcadores espectrales en las bebidas destiladas mexicanas (tequila, mezcal, bacanora y sotol) utilizadas en este trabajo.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Para realizar este trabajo se adquirieron muestras de bebidas destiladas de diferentes marcas comerciales de tequila, mezcal, bacanora y sotol de las clases blanco, joven, reposado, añejo, extra añejo y cristalino.

Obtención de perfiles espectrales FTIR - ATR

El espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) utilizado fue el modelo CARY 360 marca Agilent acoplado a un accesorio de interacción de reflexión total (ATR) con un cristal de ZnSe/diamante de un diámetro de 1.8 mm. El equipo se operó a una resolución de 4 cm^{-1} y se realizaron ocho barridos. Antes de la obtención de cada uno de los espectros se determinó la señal de fondo (*background*) del aire (Mondragón, 2015). Para la obtención de los espectros se colocó primero la muestra en el accesorio ATR (~15 mg), enseguida se tomó el espectro de infrarrojo de la muestra inicial (MI) y después se dejó evaporar (etanol y agua) a la temperatura del laboratorio (~22°C), aproximadamente durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de evaporación, se tomó el espectro de infrarrojo de la muestra residuo (MR).

Análisis estadístico por componentes principales

Los datos numéricos de los espectros FTIR obtenidos de las distintas muestras alcohólicas (número de onda contra absorbancia) fueron analizados en el programa ORIGIN utilizando el análisis por componentes principales (PCA).

Resultados y discusión

En los espectros obtenidos de las muestras iniciales (MI) se identificaron las bandas correspondientes al etanol, las diferentes alturas

están relacionadas con la concentración, lo cual se puede asociar con las diferencias en el contenido de alcohol en las distintas bebidas, tal y como se puede observar en la Figura 4. Por otro lado, en los espectros de las muestras evaporadas o de residuo (ME) (Figura 5) se observaron señales en el intervalo entre $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$, donde aparecen bandas atribuidas al estiramiento y flexión del enlace C-O, estiramiento del enlace C-O-H y C-C, enlace glicosídico del enlace C-O-C, entre otros. Dichas bandas (Figura 6) tienen diferentes alturas debido a las diferentes concentraciones, las cuales podrían estar asociadas a moléculas orgánicas correspondientes a carbohidratos, ácidos, ésteres, furanos y terpenos, resultado del proceso de maduración en la barrica o acabado, respectivo, lo cual se podría interpretar como una diferenciación entre las distintas bebidas destiladas investigadas.

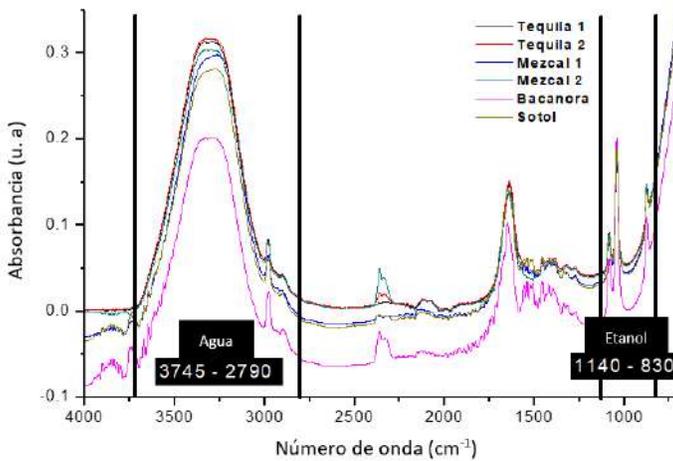


Figura 4. Espectros FTIR - ATR ($4000 \text{ a } 700 \text{ cm}^{-1}$) de tequila, mezcal, bacanora y sotol en la muestra inicial (MI)

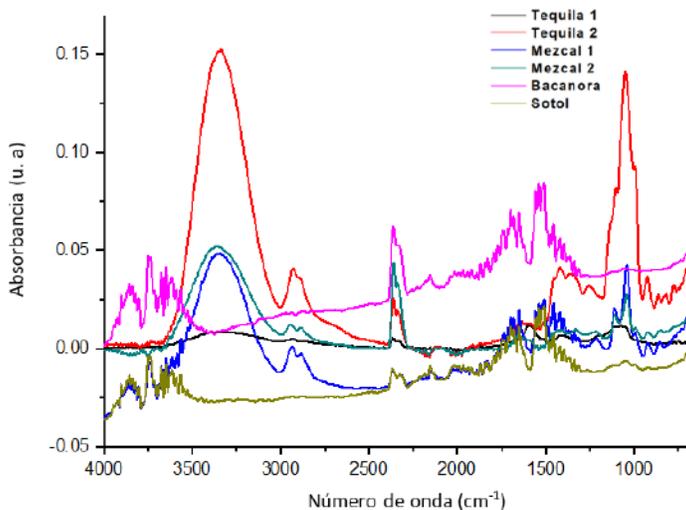


Figura 5. Espectros FTIR-ATR (4000 a 700 cm^{-1}) de tequila, mezcal, bacanora y sotol Tequila, Mezcal, Bacanora y Sotol, en la muestra residuo o evaporada (ME) sobre el accesorio de ATR acoplado al espectrómetro

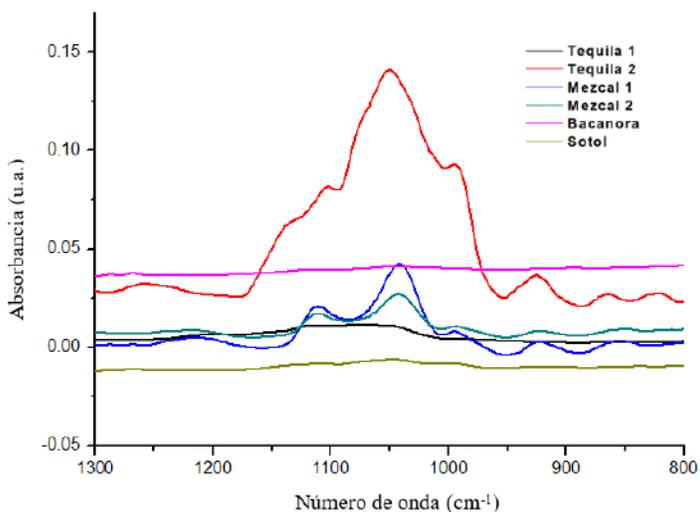


Figura 6. Espectros FTIR - ATR (1300 a 800 cm^{-1}) de tequila, mezcal, bacanora y sotol Tequila, Mezcal, Bacanora y Sotol, en la muestra evaporada (ME) sobre el cristal del accesorio de ATR

Además, en la Figura 7 se muestran los espectros de infrarrojo de muestras de tequila, mezcal, bacanora y sotol leídos de su muestra inicial (MI) y la muestra residuo o evaporada (ME), en donde se puede observar que en el espectro de la muestra de tequila las bandas son más intensas (1105, 1050, 991 y 926 cm^{-1}) que en los espectros de infrarrojo del mezcal y bacanora.

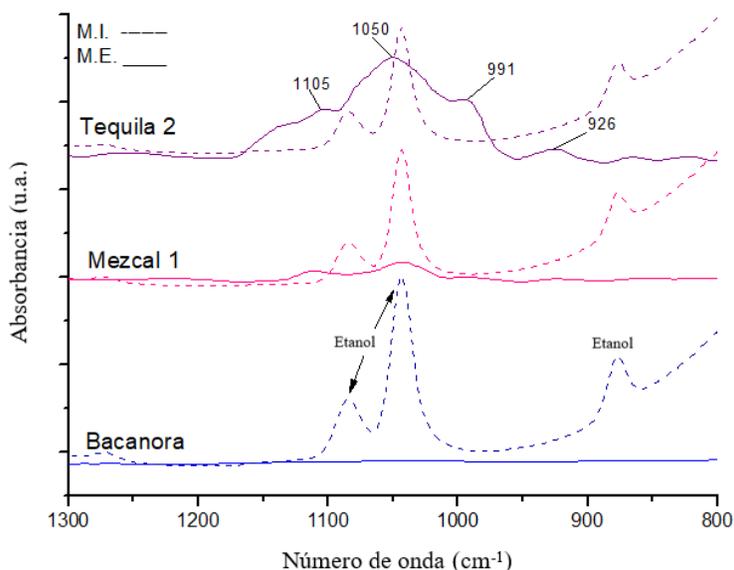


Figura 7. Espectros de FTIR – ATR (1300 a 800 cm^{-1}) de tequila, mezcal y bacanora. Con línea punteada se encuentra representado el espectro de la muestra inicial (M. I) y con línea continua los espectros de las muestras evaporadas (M. E) en el accesorio de ATR del espectrómetro

Por otro lado, el análisis por componentes principales de los espectros de FTIR obtenidos de las muestras de las diferentes bebidas alcohólicas utilizadas en este trabajo (tequila, mezcal y bacanora) antes y después de la evaporación de las muestras en el accesorio de ATR acoplado al espectrómetro se observa (Figura 8) el agrupamiento de muestras, lo cual significa que la mayoría de las muestras presentaron espectros con bandas de absorción en la región del espectro entre 1300 y 800 cm^{-1} (similares a los de la Figura 7). Mientras que aquellas

muestras que no se encuentran agrupadas no presentaron bandas similares en la región mencionada.

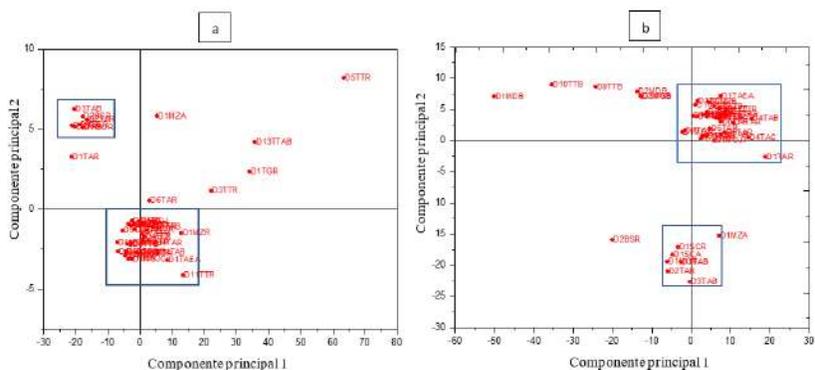


Figura 8. Análisis por componentes principales, a partir de los espectros FTIR obtenidos, del conjunto de muestras de bebidas alcohólicas: a) muestras iniciales y b) muestras evaporadas en el accesorio de ATR

Conclusiones

En este trabajo se llevó a cabo la obtención de la huella digital de las bebidas destiladas mexicanas utilizando la técnica de FTIR – ATR en la región de 1300 a 800 cm^{-1} , cuando las muestras se sometieron a una evaporación en el cristal del accesorio de ATR acoplado al espectrómetro. De este modo se logró la identificación de posibles marcadores a distintas frecuencias y absorbancias en los distintos destilados madurados analizados, los cuales podrían asociarse con moléculas generadas en las bebidas durante su proceso de madurado en barricas.

Referencias

- Consejo Regulador del Tequila. (2019). *Proceso de elaboración de tequila*. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/el-tequila-3/elaboracion-normativa?start=1>.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Mondragón, P. (2015). *Application of FTIR spectroscopy in combination with ATR for the determination of maturation indexes in tequilas*. Congreso internacional biología, química y agronomía, Guadalajara. Jalisco.
- Mondragón, P. (2020). La espectroscopia FTIR-ATR aplicada al análisis de alimentos y bebidas. En *Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas* (83-96). CONACYT-CIATEJ.
- Norma Oficial Mexicana. (2012). *Bebidas alcohólicas-tequila-especificaciones*. (NOM-006-SCFI).
- Norma Oficial Mexicana. (2016). *Bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones*. (NOM-070-SCFI).
- Norma Oficial Mexicana. (2004). *Bebidas alcohólicas-sotol-especificaciones y métodos de prueba*. (NOM-159-SCFI).
- Norma Oficial Mexicana. (2004). *Bebidas alcohólicas-Bacanora-Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado*. (NOM-168-SCFI).

2.6 COMPARACIÓN DE CINCO PROCESOS FERMENTATIVOS PARA LA ELABORACIÓN DE COMITECO

Alma G. Verdugo-Valdez¹, Dulce Valdivieso-Solís¹, Patricia Lappe-Oliveras², Manuel R. Kirchmayr³, Carolina Orantes-García¹, Silvia Sánchez-Cortés¹ y Anne C. Gschaedler³

RESUMEN

Este capítulo describe el proceso artesanal de elaboración del comiteco, una bebida alcohólica chiapaneca hecha a partir de la fermentación del aguamiel de agave y piloncillo o “panela”. El objetivo del estudio fue analizar la asociación entre el proceso de elaboración artesanal del comiteco y las levaduras involucradas en el microambiente de fermentación como efecto de la técnica de manufactura empleada por dos distintos productores. Se trabajó con dos productores diferentes y se recolectaron muestras a lo largo de los procesos de fermentación para identificar y cuantificar azúcares reductores totales, compuestos volátiles principales y ácidos orgánicos. Se llevaron a cabo análisis fenotípicos, bioquímicos y proteicos por MALDI-TOF/MS para identificar las levaduras presentes, encontrándose la presencia de *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon asahii* y *Geotrichum silvicola*. Los resultados mostraron que, aunque los dos productores seguían la misma receta general y

¹ Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Nte. Pte. 1150, Colonia Lajas Maciel Cp. 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *alma.verdugo@unicach.mx

² Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México, México.

³ Centro de Investigación y Asistencia en Diseño del Estado de Jalisco A.C, Camino Arenero 1227, Col. El Bajío, 45019, Zapopan, Jalisco, México.

utilizaban las mismas materias primas, cada uno tenía un método particular para elaborar la bebida que afectó el desarrollo de la microbiota durante la fermentación. El capítulo detalla los pasos del proceso de elaboración del comiteco destacando la importancia que esto conlleva sobre la protección y preservación de la tradición cultural y la biodiversidad microbiana asociada a la bebida.

PALABRAS CLAVE: Comiteco, agave, levaduras.

Introducción

En la Meseta Comiteca Tojolabal de Chiapas se ha aprendido a aprovechar los agaves como un recurso natural para obtener el comiteco, el cual es una bebida chiapaneca producida desde mediados del siglo XIX como una actividad económica en pequeña escala, se inició con la llegada de los frailes dominicos, quienes introdujeron la destilación en la región (Moreno-Terrazas *et al.*, 2017). La elaboración del comiteco sigue siendo predominantemente artesanal; para su elaboración se han utilizado las especies *Agave americana* L. (es la especie que se usa primordialmente) y *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. Esta bebida es un destilado de la fermentación de una mezcla de aguamiel de agave y piloncillo o “panela” que se puede encontrar en distintos grados de añejamiento y sabores (Reynoso-Santos *et al.*, 2012). El objetivo de este trabajo fue analizar la asociación entre el proceso de elaboración artesanal del comiteco y las levaduras involucradas en el microambiente de fermentación como efecto de la técnica de manufactura empleada por dos distintos productores.

Materiales y métodos

Se trabajó con dos productores diferentes; en 2017 uno de ellos (productor A) elaboró dos lotes de comiteco (P1 y P2); mientras que el otro productor (productor B), un lote (P3). En 2018 el productor A elaboró un lote de comiteco (P4); el productor B, también un lote de la bebida (P5); la elaboración de la bebida se llevó a cabo según las variantes de

cada productor. Las muestras se colectaron a lo largo de los procesos de fermentación, sembrando diluciones seriadas en cajas Petri con medio WL (Wallerstein) adicionado con cloranfenicol al 0.05%. Los aislamientos de levaduras se identificaron por su perfil fenotípico, bioquímico (Barnet *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011) y proteico por MALDI-TOF/MS. En cada evento de muestreo se identificaron y cuantificaron azúcares reductores totales, compuestos volátiles principales y ácidos orgánicos por GC y HPLC (Verdugo *et al.*, 2011; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). Para establecer la relación de las levaduras con el microambiente de fermentación se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales.

Resultados y discusión

Los cinco procesos de elaboración de comiteco siguieron la misma receta general y utilizaron las mismas materias primas, pero cada productor tenía un método particular para elaborar la bebida que afectó el desarrollo de la microbiota durante la fermentación. Según el trabajo de investigación de Valdivieso-Solís (2019), la producción del comiteco se lleva a cabo a través de los siguientes pasos:

1. Obtención de aguamiel de agave (Figura 1): Primeramente, la materia prima principal del comiteco es el aguamiel que es colectado del tallo (corazón) del agave. A la planta de agave, una vez alcanzados los 6 a 8 años, o cuando empieza a brotar el quiote, se le excava un orificio en el tallo (cajete) para la acumulación del aguamiel que se raspa diariamente para propiciar el brote del mismo.



Figura 1. Cajete excavado en la base del tronco de *Agave americana* para la extracción del aguamiel

2. El aguamiel colectado diariamente se va guardando en garrafas de 20 litros, dependiendo del productor; esta es almacenada en refrigeración o a temperatura ambiente hasta completar los litros solicitados por el productor de comiteco (se reúnen aproximadamente 2 litros por colecta en cada agave). La duración del aguamiel hasta su próximo destino depende también de la cantidad de plantas que se estén empleado para completar la cantidad requerida, además de la edad de la planta y la época en que se está colectando.

3. Preparación de puesta inicial (Figura 2): Una vez teniendo la materia prima, se procede a la preparación del mosto, para esto se agrega el aguamiel, el piloncillo o panela y puede o no llevar agua en un recipiente donde se realizará posteriormente la fermentación (el material del recipiente, tamaño y otras características depende del productor). Las proporciones de cada uno de estos ingredientes difieren en cada proceso además de que, al ser un proceso artesanal desde la obtención de la materia prima, la composición de cada uno, el manejo y tratamiento que han llevado son diferentes cada vez. El agua que es usada por los productores también puede influir de alguna manera, hay productores que utilizan agua de la llave, otros la obtienen de una fuente de agua pública, otros utilizan agua de garrafón, etc. Cada una presenta propiedades diferentes, además de que se pueden presentar microorganismos desde ahí; por otro lado, el aguamiel utilizado pudo haber sido guardado durante algunos días, lo cual también influye en la composición a la hora de ser agregado a la preparación. En cuanto a la panela, los lotes de preparación de panela son muy grandes, la producción no es homogénea durante todo el año, depende de las lluvias, de la disponibilidad de caña de azúcar, además hay panela que es guardada durante un año o más y posteriormente es utilizada.



Figura 2. Elaboración de la puesta inicial. Mezcla de aguamiel, piloncillo y agua en proporción particular de cada productor.

4. Fermentación (Figura 3): Una vez teniendo la preparación inicial, inmediatamente comienzan los procesos químicos dentro de este en la tina, hay producción de espuma y cambio de color y olor en la puesta, esto demuestra a cada productor que está “trabajando” (burbujeo, se dice que está hirviendo) y conforme este comportamiento el productor procede a monitorearla.



Figura 3. Aspecto de la tina de fermentación “trabajando” a tres días de iniciado el proceso

5. Destilado (Figura 4): Una vez que cada productor, de acuerdo a sus conocimientos, decide que la puesta está en su punto máximo, que el contenido de alcohol es bueno y que el olor y sabor indican que el sabor en la bebida final será el adecuado, proceden a realizar la destilación. La destilación es llevada a cabo en alambiques de distinto material, según sea la preferencia

del productor, puede ser de barro, acero inoxidable, aluminio, etc., sentado sobre un horno de leña o ya sea calentado por gas. El alambique está conectado a un recipiente alto en forma de cabeza por el cual suben los vapores y son llevados posteriormente a un cilindro que conecta un serpentín sumergido en agua corriente o en un tanque de agua fría, por el cual se condensan los vapores y como producto de salida se obtiene el comiteco.



Figura 4. Dos aparatos diferentes de destilación del comiteco.

Izquierda: tambos de aluminio con recipientes de barro que concentran los vapores que posteriormente llegan al serpentín que se encuentra dentro del tanque con agua estacionaria para condensación de vapores. Derecha: tinaco con agua corriente en el cual se encuentra un serpentín dentro para condensación de vapores. Ambos al aire libre y funcionan con leña.

Los métodos de elaboración artesanal del comiteco, en el caso de los dos productores con los que se trabajó, exhiben particularidades que explican los resultados respecto al comportamiento de la microbiota recuperada de los procesos de fermentación en los que se observó que la composición de la población de levaduras varió en los dos años consecutivos, como ocurre también en otras bebidas artesanales, tanto derivadas de agave –como es el caso del mezcal–, como de bebidas elaboradas a partir de otras materias primas –como la taberna–, que es elaborada en Chiapas a partir de la fermentación de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) (Ambrocio-Ríos

et al., 2022). Esto se debe a que los compuestos químicos que se generan pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas de cultivo o pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, pueden depender de las características del mosto y condiciones del proceso, como lo señalan Vera-Guzmán *et al.* (2009). En general, la diversidad de especies de levaduras encontradas (Cuadro 1) fue baja en comparación con otras bebidas de agave (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Especies de levaduras identificadas en los cinco diferentes procesos de fermentación. Las cifras indican la población viable (UFC/mL)

Especies	Procesos de fermentación				
	P1	P2	P3	P4	P5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	4.5x10 ³	7.7x10 ²	7.5x10 ²		1.3x10 ⁷
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	3.5x10 ²				
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4.7x10 ²	1.3x10 ⁴		1.9x10 ⁷	1.0x10 ⁷
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			3.1x10 ²		
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>		1.0x10 ³			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				4.8x10 ⁸	5.3x10 ⁸
<i>Trichosporon asabii</i>			8.2x10 ²		
<i>Geotrichum silvicola</i>		1.6x10 ²	1.1x10 ³		

Así mismo, se detectaron niveles bajos de metanol, ácidos orgánicos y alcoholes superiores, mientras que las concentraciones de aldehídos y ésteres alcanzaron niveles altos, principalmente en el proceso 4. A través del Análisis de Componentes Principales (PCA) las PC 1 y 2 explicaron el 63.59% de la varianza y fue evidente la separación de los procesos muestreados en los dos años (Figura 5).

Comparación de cinco procesos fermentativos para la elaboración de comiteco

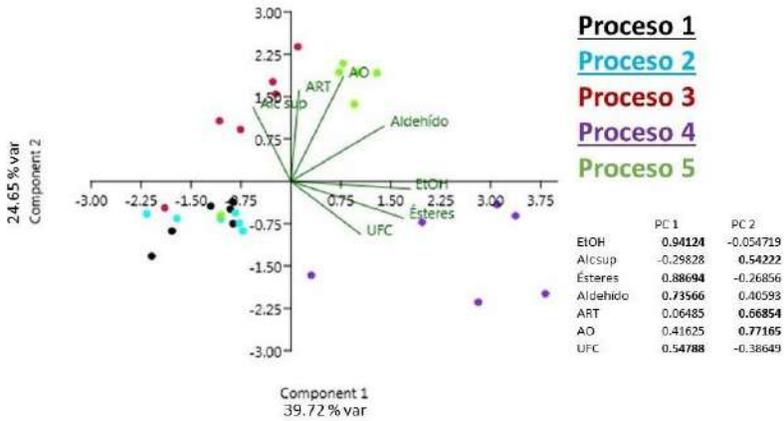


Figura 5. Analisis de componentes principales de los compuestos químicos y los procesos de fermentación del comiteco en 2017 y 2018. Los procesos subrayados fueron elaborados por el productor A y los no subrayados por el productor B

Conclusiones

La riqueza de especies de levaduras en los procesos estudiados en el primer año de muestreo fue mayor que en el segundo y sólo se identificaron especies no-*Saccharomyces*, mientras que en el segundo año *S. cerevisiae* fue la especie dominante. Estos resultados muestran que el método particular seguido por cada productor para elaborar comiteco juega un papel importante en la diversidad de levaduras y las características químicas del producto final.

Referencias

- Ambrocio-Ríos, J. A., Orantes-García, C., Sánchez-Cortés, M. S., & Verdugo-Valdez, A. G. (2021) Use of the Coyol Palm (*Acrocomia aculeata*) for the Production of “Taberna,” a Traditional Fermented Beverage in México. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 695494. doi: 10.3389/fsufs.2021.695494.
- Barnett, J. A., Payne R. W., & Yarrow D. (2000). *Yeast: Characteristics and Identification, 3rd edition*. Cambridge University Press.
- Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts. A taxonomic study. 5th ed.* Elsevier.
- Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, Arrizón-Gaviño J, Herrera-Suárez T, García-Mendoza A, & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non-distilled and distilled *Agave beverages*. *FEMS Yeast Research*, 8, 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Moreno-Terrazas R., Escalante, A., Verdugo-Valdez, A. G., De la Rosa, M., Ortiz, R. I., Orantes-García, C., Palafox-González, L., Castro, A., Lappe-Oliveras, P. (2017). Bebidas tradicionales y nuevas alternativas, Sección I: Bebidas Refrescantes y alcohólicas de agave. En A. Gschaedler (coord.), *Panorama del aprovechamiento de los agaves en México* (pp. 123-163). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves, México.
- Reynoso-Santos, R., García-Mendoza, A., López-Báez, W., López-Luna, A., Cadena, P., Pérez-Farrera, M. & Domínguez, M. (2012). Identificación taxonómica de agaves (*Agave spp.*) utilizados para la elaboración del licor comiteco en Chiapas, México, *Agroproductividad*, 5(4), 9-17.
- Santiago-Urbina, J., Verdugo-Valdez, A., & Ruíz-Terán, F. (2013). Physicochemical and microbiological changes during tapping of palm sap to produce an alcoholic beverage called “taberna”, which is produced in the south east of Mexico. *Food Control*, 33,58-62. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.010>

Verdugo Valdez, A., Segura García, L., Kirchmayr, M., Ramírez Rodríguez, P., González Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *100*(4), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>

3-. Fructanos y otros derivados del agave



3.1 PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN DE FRUCTANOS DE AGAVE: *FOULING* O ENSUCIAMIENTO DE MEMBRANAS DE CERAMICA

Noé Luiz-Santos¹, Rosa María Camacho-Ruiz²,
Jorge Alberto García-Fajardo¹ y Lorena Moreno-Vilet^{2*}

RESUMEN

Los fructanos de agave son carbohidratos que se comercializan como una mezcla de distintos tamaños. Sin embargo, se ha demostrado que la separación por tamaño en fructooligosacáridos (FOS) y fructanos de alto peso molecular (FAPM) permite la diversificación en aplicaciones específicas y/o mejoradas. El objetivo de este estudio fue evaluar el proceso de obstrucción a través de la resistencia de ensuciamiento generada durante el fraccionamiento de fructanos de agave para la obtención de FOS y FAPM mediante un proceso de ultrafiltración a nivel piloto utilizando una membrana de cerámica con corte molecular de 1 kDa. El análisis del ensuciamiento mostró que las condiciones de 60°C, 5 bar de presión y concentración de 150 kg.m⁻³ favorece los bajos valores de resistencia relacionados con el menor ensuciamiento de la membrana.

PALABRAS CLAVE: ultrafiltración; fructanos de agave; fraccionamiento

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Autopista Mty-Aeropuerto, Vía de la Innovación 404, Parque PIIT, 66628, Apodaca, Nuevo León, México.

² Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Camino arenero 1227, El Bajío, 45019, Zapopan, Jalisco. México.
*lmoreno@ciatej.mx

Introducción

Los fructanos de agave o “inulina de agave”, como se le conoce comúnmente en el mercado, se comercializan como una mezcla de polímeros de fructosa de diferentes tamaños, que han sido utilizados como ingredientes en la industria de alimentos y bebidas, así como en la elaboración de excipientes farmacéuticos. Lo anterior, ya que han mostrado beneficios a la salud como fibra prebiótica, disminución de triglicéridos y glucosa en sangre (Padilla-Camberos *et al.*, 2018; Ramnani *et al.*, 2015; Urías-Silvas *et al.*, 2008); así como por sus aplicaciones como agentes encapsulantes, emulsificantes y como sustitutos de la grasa en los alimentos (Ortiz-Basurto *et al.*, 2017; Palatnik *et al.*, 2017).

En los últimos años se ha buscado diversificar el uso de los fructanos de agave de acuerdo con la longitud de su cadena en FAPM y FOS en aplicaciones específicas para la salud (Márquez-Aguirre *et al.*, 2013, 2016). Para ello se ha utilizado la tecnología de membranas (Tabla 1) como barrera selectiva en la separación de fructanos de agave (Flores-Montaña *et al.*, 2015; Pérez-Martínez *et al.*, 2013).

Tabla 1. Principales características de los procesos con membranas utilizando presión como fuerza impulsora

Proceso	Presión típica (bar)	Peso molecular (Da)	Tamaño de poro (nm)	Partículas que retienen
MF	0.5-2	No aplica	100-10 000	Hongos, levaduras, bacterias, coloides
UF	1-10	1000-300 000	1-100	Coloides, virus, proteínas, polisacáridos
NF	10-70	>100	0.5-5	Azúcares, sales divalentes
OI	10-100	>10	<1	Iones, ácidos orgánicos, azúcares

Fuente: Adaptado de (Fane *et al.*, 2010; Pérez Fernández, 2017).

Esta separación se realiza mediante un sistema de filtración compuesto por una serie de bombas con el fin de elevar la presión (1-10 bar) requerida por la membrana. La membrana es la barrera semipermeable encargada de la separación por tamaño de las moléculas, cuya

eficiencia de separación y obstrucción depende en gran medida del material y configuración de la membrana. La corriente que atraviesa la membrana se le denomina permeado o filtrado, donde se obtiene un producto enriquecido en FOS, mientras que las moléculas de mayor tamaño (FAPM) se obtienen en la línea de retenido (Figura 1)

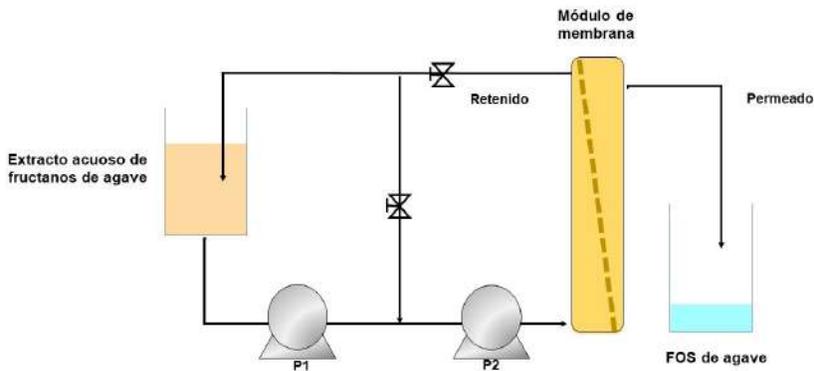


Figura 1. Diagrama esquemático del proceso de fraccionamiento de fructanos de agave. P1 y P2: Bombas de alimentación

La tecnología de membranas tiene el potencial para fraccionar fructanos a mayor escala; sin embargo, para poder adaptar un proceso de manera exitosa a nivel industrial es necesario tener información de la separación, rendimiento y obstrucción de las membranas. El proceso de obstrucción está definido por el término de ensuciamiento o *fouling*, el cual es la acumulación de componentes sobre la superficie de la membrana y/o en el interior de sus poros. Se trata de un fenómeno intrínseco de la operación de la membrana por el hecho de la propia filtración. Dicho fenómeno de ensuciamiento impacta en la disminución de la productividad y vida útil de la membrana, haciendo necesario detener el proceso para limpieza, por lo que impacta en la productividad y costo del proceso.

El fraccionamiento de fructanos de agave se ha descrito utilizando configuración de membranas poliméricas en espiral, logrando obtener fructanos libres de mono y disacáridos con un nivel de pureza del 97% (Luiz-Santos *et al.*, 2020). Por su parte, las membranas ce-

rámicas mostraron eficiencia en el fraccionamiento de fructanos de agave (Luiz-Santos *et al.*, 2022). Sin embargo, poco se ha estudiado respecto al tema de obstrucción de la membrana para fructanos de agave, limitando la implementación del proceso a mayor escala. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las condiciones de operación que afectan el ensuciamiento de membranas de cerámica durante el proceso de fraccionamiento de fructanos de agave por ultrafiltración fina.

Uno de los modelos matemáticos utilizados para el estudio del ensuciamiento de membranas es el modelo de resistencia en serie. Este modelo permite evaluar el ensuciamiento como resultado del análisis de la suma de resistencias involucradas en el proceso, como lo son: resistencia de la membrana al paso del solvente, resistencia generada por las moléculas que se depositan en la superficie e interior de la membrana (ensuciamiento). En este trabajo se muestra la evaluación de factores como la temperatura, presión transmembrana (TMP) y concentración utilizadas sobre la resistencia del ensuciamiento en el proceso de fraccionamiento de fructanos de agave por ultrafiltración.

Materiales y métodos

Fructanos de agave

Los experimentos se realizaron utilizando fructanos nativos de agave (Olifructine®) proporcionados por Nutriagaves de México, cuya estructura es conocida como ramificada por sus enlaces β (2-1) y β (2-6). Los análisis de peso molecular mostraron que contiene un grado de polimerización promedio (GP) de 16.3, con la siguiente distribución de tamaños 64.90% de FAPM (GP > 10), 23.77% de FOS (GP entre 3–10) y 11.33% de mono y disacáridos (GP 1-2) como la glucosa, fructosa y sacarosa. La concentración de sólidos solubles totales se ajustó utilizando un refractómetro digital (Pal- α , ATAGO, Tokio, Japón) en °Bx, de acuerdo con el nivel de diseño experimental y expresado en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

Estudio del ensuciamiento de membranas de cerámica

Para estudiar el ensuciamiento de la membrana durante el proceso de Ultrafiltración se utilizó un sistema de filtración a escala piloto diseño de CIATEJ, con membranas de ultrafiltración de TiO_2 de 1 kDa (interior-Céram, TAMI Industries, Francia).

En la Tabla 2 se muestran las condiciones experimentales para el estudio del ensuciamiento durante el fraccionamiento fueron evaluadas utilizando un diseño Box- Behnken en los siguientes rangos: Temperatura (30-60°C), TMP (1-5 bar) y concentración (50-150 $Kg.m^{-3}$). Se realizaron ensayos de 100 L para cada condición evaluada.

Tabla 2. Factores y niveles evaluados mediante el diseño Box-Behnken

Factores	Código	Niveles		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	X_1	30	45	60
TMP (bar)	X_2	1	3	5
Concentración ($kg.m^{-3}$)	X_3	50	100	150

La relación entre los factores temperatura (X1), TMP (X2), concentración de alimento (X3) y las variables de respuesta se ajustaron a un modelo lineal (Ec.1) o cuadrático (Ec.2) utilizando el software estadístico Design Expert con un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ($p < 0.005$). Se eligió el modelo con mejor ajuste.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (2)$$

Donde Y es la variable de respuesta (resistencia del ensuciamiento), β_0 es una constante obtenida a partir de los valores medios de respuesta, β_1, β_2 y β_3 son los coeficientes del efecto lineal, β_{11}, β_{22} y β_{33} son los coeficientes del efecto cuadrático y β_{12}, β_{13} y β_{23} son los coeficientes del efecto de interacción.

Las resistencias atribuidas al ensuciamiento de la membrana se expresaron según el modelo de resistencias en serie como se muestra en la Ec.3 (Chhaya *et al.*, 2012).

$$J_p = \frac{TMP}{\mu \cdot R_t} \quad (3)$$

Donde J_p es el flujo de permeado de los fructanos, μ viscosidad en el permeado y R_t es la resistencia total del sistema de membranas. La resistencia total del sistema de membranas (Ec.4) es la suma de la resistencia intrínseca de la membrana (R_m), donde la resistencia al ensuciamiento (R_f) representa el ensuciamiento reversible e irreversible. Donde los valores más bajos de R_f se consideran deseados.

$$R_t = R_m + R_f \quad (4)$$

Resultados y discusión

Proceso de obstrucción: ensuciamiento de membranas durante el fraccionamiento de fructanos de agave

La evaluación del ensuciamiento de la membrana durante el proceso de ultrafiltración de fructanos de agave se realizó analizando la resistencia al ensuciamiento (R_f), de un total de 16 corridas experimentales. El análisis estadístico mostró que la temperatura, TMP y la concentración fueron factores significativos. De igual manera que la interacción temperatura-TMP y TMP^2 , tienen un efecto significativo ($p < 0.005$) y R^2 de 92.06%.

La ecuación que presentó el mejor ajuste fue el modelo cuadrático para R_f , como se muestra en la Ecuación 5. En el cual los valores negativos de los factores e interacciones producen una disminución de los valores de R_f , que son los deseados en este estudio.

$$R_f = 1.8168 \cdot 10^{16} - 2.8613 \cdot 10^{14} T - 3.9636 \cdot 10^{15} \cdot TMP - 2.5948 \cdot C + 2.6581 \cdot 10^{13} \cdot T \cdot TMP + 3.5245 \cdot 10^{12} \cdot TMP \cdot C + 1.6720 \cdot 10^{12} \cdot T^2 + 2.8640 \cdot 10^{14} \cdot TMP^2 \quad (5)$$

La Figura 2 muestra los principales efectos de los factores estudiados y sus interacciones en el proceso de ensuciamiento de la membrana. Cuanto menor sea la TMP y la concentración utilizada, mayor es el ensuciamiento; esto se debe a que a la temperatura de 30°C la viscosidad es mayor en comparación con temperaturas de 60°C (Rodríguez-González *et al.*, 2019). Adicionalmente se ha reportado que a concentraciones de 50 Kg·m³ los fructanos de agave adoptan una estructura extendida (Ponce *et al.*, 2008), es decir, su volumen molar es mayor, lo que dificulta que pasen a través de los poros de la membrana, por lo que para compensar este hecho se requiere utilizar valores de TMP mayores a 3 bar para vencer esa resistencia. Sin embargo, se observa que la resistencia al ensuciamiento disminuye con el aumento de la concentración de fructanos debido a la disminución del volumen molar de los fructanos en combinación con temperaturas de 60°C y 5 bar de TMP.

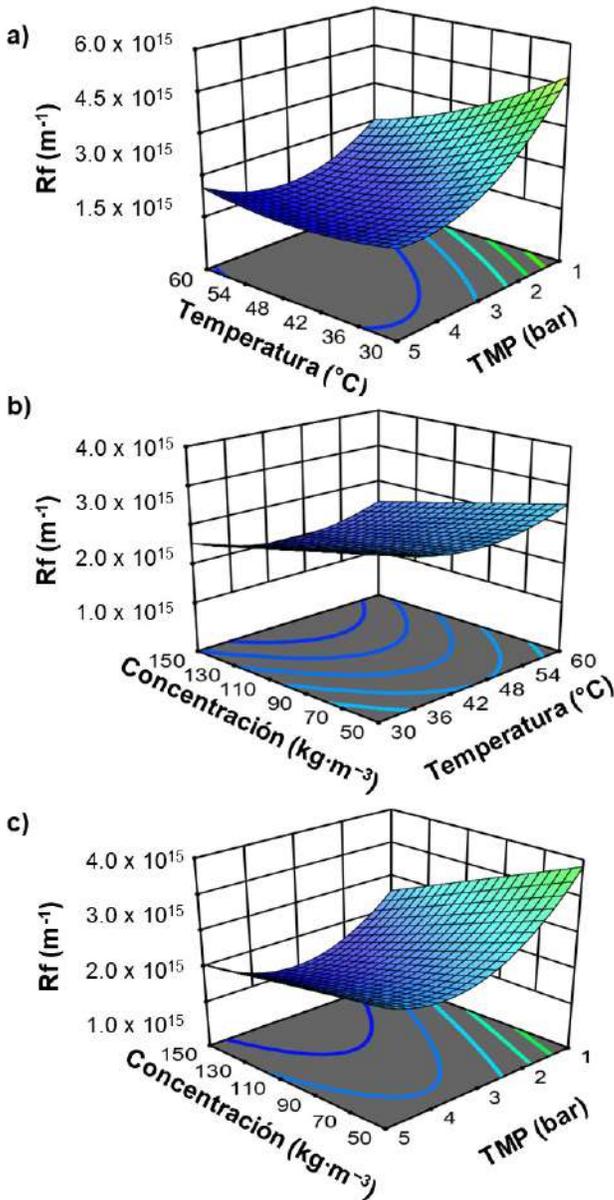


Figura 2. Superficie de respuesta obtenida para resistencia del ensuciamiento en función de a) temperatura, TMP y $150 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$; b) concentración, temperatura y 5 bar; c) concentración, TMP y $60^{\circ}C$.

Conclusiones

Se evaluaron los factores de concentración de alimentación, la temperatura y TMP sobre la resistencia de ensuciamiento de membrana en el proceso de fraccionamiento de fructanos de agave. Los valores que permiten reducir el ensuciamiento durante la ultrafiltración de fructanos fueron los niveles altos evaluados (60°C, 5 bar de TMP y concentración de 150 kg.m⁻³).

Referencias

- Chhaya, C. S., Sharma, C., Mondal, S., Majumdar, G. C., & De, S. (2012). Clarification of Stevia extract by ultrafiltration: Selection criteria of the membrane and effects of operating conditions. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.10.002>
- Fane, A. G., Tang, C. Y., & Wang, R. (2010). Membrane Technology for Water: Microfiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration, and Reverse Osmosis. *Treatise on Water Science*, 4, 301–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53199-5.00091-9>
- Flores-Montaño, J. L., Camacho-Ruiz, R. M., Prado-Ramírez, R., Moreno-Vilet, L., Luiz-Santos, N., Mendoza-Rivera, M. de los Á., & Ballón-Villagrà, A. (2015). *Fructanos fraccionados de Agave y su proceso de obtención a nivel piloto e industrial* (Patent No. MX/a/2015/014523).
- Luiz-Santos, N., Prado-Ramírez, R., Arriola-Guevara, E., Camacho-Ruiz, R. M., & Moreno-Vilet, L. (2020). Performance evaluation of tight ultrafiltration membrane systems at pilot scale for agave fructans fractionation and purification. *Membranes*, 10(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/membranes10100261>
- Luiz-Santos, N., Prado-Ramírez, R., Camacho-Ruiz, R. M., Guatemala-Morales, G. M., Arriola-Guevara, E., & Moreno-Vilet, L. (2022). Effect of Operating Conditions and Fructans Size Distribution on Tight Ultrafiltration Process for Agave Fructans Fractionation : Optimization and Modeling. *Membranes*, 12. <https://doi.org/10.3390/membranes12060575>

- Márquez-Aguirre, A. L., Camacho-Ruiz, R. M., Arriaga-Alba, M., Padilla-Camberos, E., Kirchmayr, M. R., Blasco, J. L., & González-Avila, M. (2013). Effects of Agave tequilana fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal Lactobacilli/Bifidobacteria in obese mice. *Food and Function*, 4(8), 1237–1244. <https://doi.org/10.1039/c3fo60083a>
- Márquez-Aguirre, A. L., Camacho-Ruiz, R. M., Gutiérrez-Mercado, Y. K., Padilla-Camberos, E., González-Ávila, M., Gálvez-Gastélum, F. J., Díaz-Martínez, N. ., & Ortuño-Sahagún, D. (2016). Fructans from Agave tequilana with a Lower Degree of Polymerization Prevent Weight Gain, Hyperglycemia and Liver Steatosis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 416–421. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0578-x>
- Ortiz-Basurto, R. I., Rubio-Ibarra, M. E., Ragazzo-Sanchez, J. A., Beristain, C. I., & Jiménez-Fernández, M. (2017). Microencapsulation of Eugenia uniflora L. juice by spray drying using fructans with different degrees of polymerisation. *Carbohydrate Polymers*, 175, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.030>
- Padilla-Camberos, E., Barragán-Álvarez, C. P., Diaz-Martinez, N. E., Rathod, V., & Flores-Fernández, J. M. (2018). Effects of Agave fructans (Agave tequilana Weber var. azul) on Body Fat and Serum Lipids in Obesity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 34–39. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0654-5>
- Palatnik, D. R., Aldrete Herrera, P., Rinaldoni, A. N., Ortiz Basurto, R. I., & Campderrós, M. E. (2017). Development of reduced-fat cheeses with the addition of Agave fructans. *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), 212–219. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12334>
- Pérez-Martínez, F. J., González-Ávila, M., Camacho-Ruiz, R. M., Márquez-Aguirre, A. L., Alonso Segura, D., Gschaedler Mathis, A. C., Prado-Ramírez, R., Flores Montaña, J. L., Mateos Díaz, J. C., Arrizón Gaviño, J. P., & Rodríguez González, J. A. (2013). *Fructanos fraccionados de agave, proceso de obtención y uso de los mismos*. <https://ciatej.mx/patentes/22.pdf>

- Pérez Fernández, D. A. (2017). *Optimización de parámetros de operación en procesos de ultrafiltración para la eliminación de materia orgánica en la regeneración de aguas de proceso de una industria papelera*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ponce S., J. A., Macías B., E. R., Soltero M., J. F., Fernández E., V. V., Zúñiga P., V., & Escalona B, H. B. (2008). Propiedades físico-químicas y reológicas no lineales de soluciones acuosas de fructanos de agave. *e-Gnosis*, 6(), 1-23.
- Ramrani, P., Costabile, A., Bustillo, A. G. R., & Gibson, G. R. (2015). A randomised, double-blind, cross-over study investigating the prebiotic effect of agave fructans in healthy human subjects. *Journal of Nutritional Science*, 4. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.68>
- Rodríguez-González, F., Parra-montes De Oca, M., Ávila-Reyes, S., Camacho-Díaz, B. H., Alamilla-beltrán, L., Jiménez-aporicio, A. R., & Arenas-ocampo, M. L. (2019). LWT - Food Science and Technology A rheological study of chicory and agave tequilana fructans for use in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 115(January), 108137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.035>
- Uriás-Silvas, J. E., Cani, P. D., Delmée, E., Neyrinck, A., López, M. G., & Delzenne, N. M. (2008). Physiological effects of dietary fructans extracted from Agave tequilana Gto. and Dasyilirion spp. *British Journal of Nutrition*, 99(2), 254–261. <https://doi.org/10.1017/S0007114507795338>

3.2 EFECTO DE MEZCLAS DE FRUCTANOS LINEALES Y RAMIFICADOS SOBRE LA APOPTOSIS *IN VITRO* EN CÉLULAS DE COLON

Paola Alvarez García¹, Luz E. Alcántara Quintana², Miguel A. Ruiz Cabrera¹, Raúl González García¹, Grajales Lagunes A^{1*}

RESUMEN

El cáncer de colon actualmente ocupa el segundo lugar de causas de muerte a nivel mundial, por lo que es necesario encontrar alternativas que ayuden a prevenir esta enfermedad. Se ha reportado que el consumo de fructanos reducen el riesgo de padecer cáncer de colon. El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto de fructanos lineales (chicoria) y ramificados (*Agave salmiana*) sobre la apoptosis de células de colon sanas y cancerígenas. Para el estudio se utilizaron tres tipos de células CRL1831 (sana), HT29 (cancerosa, grado 1–2) y SW480 (cancerosa, grado 3–4), las cuales fueron tratadas durante 72 horas con mezclas de fructanos lineales y ramificados a diferentes fracciones 1/0, 0/1, 0.5/0.5, 0.75/0.25, 0.25/0.75, respectivamente a tres diferentes concentraciones 2.0, 3.5 y 5%. La absorbancia a 640 nm fue determinada a través de un espectrofotómetro Thermo Scientific para evaluar el porcentaje de apoptosis. Los resultados obtenidos indican que las mezclas de fructanos lineales y ramificados fueron capaces de reducir la apoptosis de las células sanas cuando se utilizaron las fracciones de 1/0 y 0.5/0.5 de fructanos lineales y ramificados a concentraciones de 2 y 5% respectivamente. Con

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava # 6, Zona Universitaria, C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P. México. *grajales@uaslp.mx

² Coordinación para la Innovación y aplicación de Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona #550-2^a, Col. Lomas de San Luis C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P. México.

respecto a las células cancerígenas, tanto para las células HT29 y SW480 el porcentaje de apoptosis se incrementó significativamente ($p < 0.05$) con las mezclas de fructanos lineales y ramificados de 0.25/0.75 y 0.75/0.25 respectivamente. Por lo que, de manera general, estos resultados sugieren que el porcentaje de apoptosis inducido por las mezclas de fructanos fue dependiente del tipo de fructano y de la concentración, y fue posible inducir la apoptosis de las células cancerígenas y reducirla en las células sanas.

PALABRAS CLAVE: Fructanos lineales y ramificados, apoptosis, HT29, SW480.

Introducción

Las enfermedades digestivas y gastrointestinales son muy prevalentes a nivel mundial, causan malestar y pueden ser mortales. En 2019, las enfermedades digestivas representaron 2276.27 millones de casos prevalentes y 2.56 millones de muertes (Wang *et al.*, 2023). Las enfermedades gastrointestinales inflamatorias han sido asociadas como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon. El cáncer de colon es una de las enfermedades gastrointestinales malignas más frecuentes y recientemente se reportó que ocupa el segundo lugar en causas de muerte (935,000) y el tercer lugar en nuevos casos (1.93 millones) en 2020 (WHO 2021). En los países subdesarrollados, el cáncer de colon es uno de los principales problemas de salud su desarrollo ha sido asociado con la dieta, el estilo de vida, el estatus socioeconómico (Pandurangan *et al.*, 2018). En este sentido, se ha incrementado el interés de encontrar agentes o compuestos bioactivos que ayuden a prevenir las enfermedades gastrointestinales digestivas e inflamatorias.

En la literatura, se ha reportado que los prebióticos carbohidratos digeribles por la microbiota intestinal, mejoran la salud intestinal del hospedero (alivio de los síntomas de la colitis y la enfermedad de Crohn), la cual está asociada con la absorción y producción de

nutrientes, con el incremento de la barrera intestinal, la translocación de bacterias patógenas, la homeostasis metabólica, así como el buen funcionamiento del sistema inmune y la producción de metabolitos como ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Moreno Vilet *et al.*, 2014; Gibson *et al.*, 2017, Castillo Andrade *et al.*, 2018, 2019; Peredo Lovillo *et al.*, 2020).

Los fructanos son un tipo de prebióticos constituidos por una mezcla de polímeros de fructosa unidos por enlaces glucosídicos β -(2 \rightarrow 1) o β -(2 \rightarrow 6), que pueden presentar en su estructura una molécula de glucosa terminal (Corzo *et al.*, 2015). Los fructanos tipo inulina presentan estructuras lineales con enlaces β -(2 \rightarrow 1) y son sintetizados principalmente por las plantas de la familia *Asteraceae* como la chicoria (*Cichorium intybus*) (Santiago-García & López 2014). Los fructanos provenientes de los agaves presentan estructuras ramificadas con enlaces β -(2 \rightarrow 1) y/o β -(2 \rightarrow 6) que son conocidos como agavinas (Mancilla-Margalli & López, 2006). El efecto anticancerígeno de estos componentes ha sido asociado a la producción de AGCC como resultado de la fermentación de los mismos por los microorganismos intestinales. Se ha reportado que la producción de ácido acético, propiónico y butírico generan un incremento en los niveles de glutatión-S-transferasa y glutatión-transferasa-pi que contribuyen en la estabilidad de las células de colon. Adicionalmente fue reportado que la producción de butirato puede reducir el estrés oxidativo y activar enzimas procarcinógenas que contribuyen a la prevención de cáncer de colon (Peredo Lovillo *et al.*, 2020).

No obstante, estudios donde se haya evaluado el efecto anticancerígeno de la combinación de fructanos lineales y ramificados sobre células de cáncer de colon *in vitro* son escasos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto sinérgico de mezclas de fructanos lineales y ramificados sobre la apoptosis de células de colon sanas y cancerígenas *in vitro*.

Materiales y metodos

Para la realización de este estudio se utilizaron fructanos ramificados de *Agave salmiana*, los cuales fueron previamente caracterizados por

Castillo Andrade *et al.* (2018) y fructanos lineales tipo inulina Orafiti®HIS, 88% los cuales fueron donados por la empresa Beneo. El grado de polimerización de ambos fructanos fue entre 10-30.

Preparación de las mezclas de fructanos

La preparación de las mezclas de fructanos fue realizada de acuerdo a lo reportado por Alvarez-García *et al.* (2023). Un diseño experimental aleatorio D-optimal con dos variables de mezcla (fructanos lineales y ramificados) y dos variables de proceso (concentración de fructanos y tipo de células) fue utilizado. Las mezclas de fructanos correspondientes a inulina de achicoria (fructanos lineales) y fructanos de *Agave salmiana* (fructanos ramificados) se prepararon en fracciones de 1/0, 0/1, 0,5/0,5, 0,75/0,25, 0,25/0,75 respectivamente a tres concentraciones diferentes 2, 3,5 y 5%, donde la suma de la fracción másica es igual a 1.

Ensayos celulares

Para evaluar el efecto de las mezclas de fructanos sobre la apoptosis se utilizaron tres líneas de células epiteliales del colon humano CRL1831 (sana) (ATCC CRL-1831), HT29 (cancerosa, grado 1–2) (ATCC HTB-38) y SW480 (cancerosa, grado 3–4) (ATCC CCL-228). Primeramente, las mezclas de fructanos fueron disueltas en un medio RPMI y suplementadas con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos al 1% (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 0,25 µg/mL de anfotericina). Posteriormente, cada línea celular fue introducida a un medio con las mezclas de fructanos (200 µl), en placas de 96 pocillos (1 x 10⁴ células/pocillo) y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ para así implementar el ensayo multiplex ApoLive-Glo™. El tiempo de tratamiento fue de 72 h.

El ensayo multiplex ApoLive-Glo™ consiste en dos partes. La primera parte del ensayo mide la actividad de un marcador de proteasa de viabilidad celular. Mientras que en la segunda parte del ensayo se detecta la activación de caspasa 3/7, que es un biomarcador clave de

la apoptosis, este ensayo proporciona un sustrato luminógeno caspasa 3/7 que contiene la secuencia de tetrapéptidos DEVD en un reactivo optimizado para la actividad de caspasa, actividad de luciferasa y lisis celular. La adición del reactivo da como resultado la lisis celular, seguida de la escisión de caspasa del sustrato y la generación de una señal luminiscente producida por luciferasa. La luminiscencia es proporcional a la cantidad de actividad caspasa presente, las cuales fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente para después determinar la absorbancia a 620 nm a través de un espectrofotómetro Thermo Scientific (Alvarez-Garcia *et al.*, 2023).

Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) fue realizado utilizando un modelo de Scheffe (Modde 7.0 Software) de 28 parámetros conformado por un modelo cúbico para las variables de mezcla: fructanos ramificados y lineales y un modelo cuadrático para las variables de proceso: concentración y tipo de célula. Un nivel de confianza del 95% fue aplicado, y los datos fueron enviados a MATLAB 13 para realizar las gráficas de superficie de respuesta correspondientes.

Resultados y discusión

En este estudio el parámetro evaluado fue la apoptosis, la cual es definida como la muerte celular programada estrictamente controlada que ayuda a contribuir a la eliminación de células no deseadas. Esta se vio significativamente afectada ($P = 2,26E-06$ $R^2 = 0,99$) por los parámetros evaluados a las 72 horas. Las células sanas CRL1831 (Figura 1a) presentaron los porcentajes más bajos de células apoptóticas utilizando una concentración de 5%, donde los componentes predominantes fueron los fructanos lineales (1/0). De la misma manera, se observó que la mezcla de fructanos lineales y ramificados a una misma proporción (0.5/0.5) y a una concentración de 2% disminuyeron la apoptosis de las células sanas aproximadamente a 0%. Por lo tanto, esto sugiere que tanto los fructanos lineales como en mezcla lineales-ramificados fueron

capaces de disminuir significativamente el proceso de apoptosis en las células sanas CRL1831, lo cual es deseable de acuerdo a la hipótesis planteada en este estudio: las mezclas de fructanos lineales y ramificados inducen la apoptosis de las células cancerosas y se reduce en las células sanas proporcionando nutrientes para su proliferación como fue reportado por Álvarez-García *et al.* (2023).

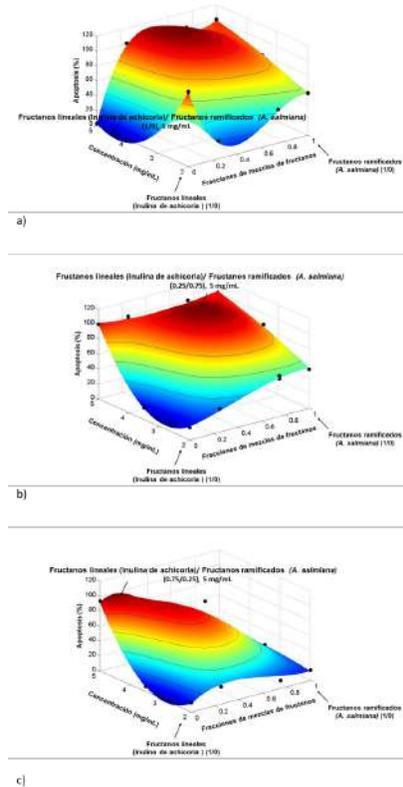


Figura 1. Porcentaje de apoptosis para las células a) CRL1831 (sanas), HT29 (cáncer grado 1-2) y SW480 (cáncer grado 3-4) a las 72 horas

Con respecto a la línea celular cancerosa HT29 (Figura 1b), el porcentaje de apoptosis se incrementó significativamente ($p < 0.05$) con mezclas de fructanos (0.25/0.75) teniendo como componente predominante los fructanos ramificados en una concentración alre-

dedor de 5%. Mientras que para las células cancerosas SW480 (Figura 1c) los porcentajes de células apoptóticas fueron significativamente ($p < 0.05$) elevados, aproximadamente 100% con mezclas de fructanos (0.75/0.25) en este caso, siendo el componente predominante los fructanos lineales a una concentración de 5%. A diferencia de las HT29, las SW480 se vieron más afectadas con la predominancia de fructanos lineales, por ende, el tipo de célula, el tiempo de tratamiento, la concentración utilizada y el tipo de fructanos utilizado son factores importantes para considerar en la apoptosis celular ya que, dependiendo del resultado que se busque, se deben de implementar estos parámetros de manera diferente. En general, las células SW480 y HT29 presentaron mayor incidencia a la apoptosis con las mezclas de fructanos, lo cual sugiere que la combinación de fructanos lineales y ramificados puede inducir la apoptosis de células de cáncer de colon suprimiendo o inhibiendo las células cancerosas, probablemente debido a sus anomalías estructurales. Estos resultados son interesantes debido a que indican que la inclusión de fructanos no fermentados también induce a la apoptosis de las células cancerígenas, ya que en la mayoría de los estudios reportados se han utilizado los metabolitos (ácido acético, propiónico y butírico) producidos después de la fermentación de prebióticos tipo inulina por bacterias para evaluar el efecto anticancerígeno. Los productos de la fermentación podrían haber incrementado la actividad de genes pro-apoptóticos que conducen a una mayor expresión de proteínas y apoptosis, dicho efecto ha sido mayormente asociado a la producción de butirato (Munjal *et al.*, 2009; Borowicki *et al.*, 2010; Arun *et al.*, 2019).

Los efectos anticancerígenos producidos por los fructanos usados en este estudio puede ser por expresiones génicas al iniciarse la señalización de los fructanos en la célula, así como la disminución de los niveles de ATP, la actividad citotóxica que incrementa los niveles del lactato deshidrogenasa (LDH).

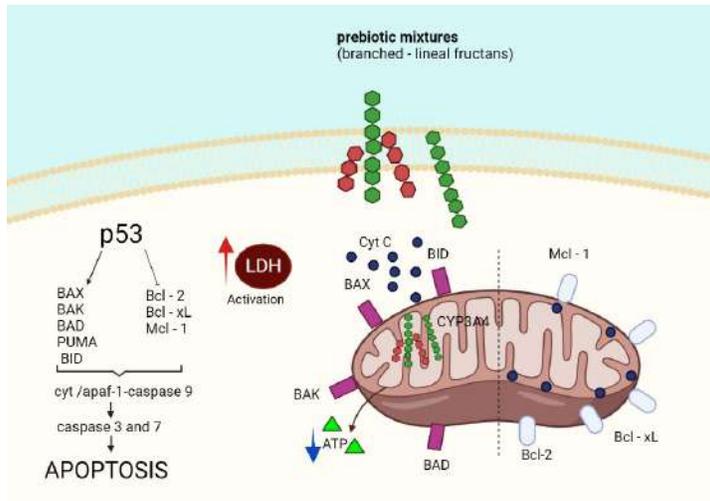


Figura 2. Diagrama esquematizado del mecanismo de apoptosis propuesto para el uso de prebióticos lineales y ramificados (adaptado de Goldstein *et al.*, 2013; Indran *et al.*, 2011; Letai, 2017)

En la Figura 2 se presenta el posible mecanismo de cómo los fructanos pudieran tener incidencia en la apoptosis, de acuerdo con lo reportado en la literatura. Primeramente, los fructanos que ingresan a la célula a través de la membrana son solubles debido a su polaridad y funcionan como marcadores biológicos y como lugares de reconocimiento celular. La proteína p53 induce la actividad de CYP3A4, y los fructanos sirven como sustratos para CYP3A4 la cual es una enzima involucrada en el metabolismo de los xenobióticos y fármacos en las células (Luo *et al.*, 2004). La proteína p53 induce la apoptosis al activar la expresión de varias proteínas proapoptóticas (PUMA, Bax, Bak y BID) y la inhibición de factores antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-XL, considerados como un potente supresor de la apoptosis que se regula al alza en algunos tipos de tumores que interactúan con las proteínas mitocondriales, impidiendo así que formen poros mitocondriales e inhibiendo la liberación de factores apoptogénicos como el citocromo c. La expresión forzada de las moléculas pro-apoptóticas puede dar como resultado un aumento

del potencial de membrana de las mitocondrias y la liberación de citocromo c, lo que induce la oligomerización de Apaf-1 y conduce a la activación de la caspasa 9. Este complejo activo cyt c/Apaf-1/caspasa 9 forma el apoptosoma y activa las caspasas 3 y 7 del verdugo, lo que da como resultado el desmantelamiento celular a través de la fragmentación nuclear (Goldstein *et al.*, 2013; Indran *et al.*, 2011; Letai, 2017). En futuras investigaciones será interesante conocer los niveles de ATP de las células cancerígenas porque está relacionada con la pérdida del potencial mitocondrial y de esta manera ayudaría a conocer el mecanismo de los fructanos en este tipo de células. Sin embargo, se requieren más estudios para conocer el mecanismo de implementación de los prebióticos directamente en este tipo de células.

Conclusiones

Las mezclas de fructanos lineales y ramificados ejercen un efecto anticancerígeno sobre células cancerosas de colon HT29 y SW480. Las mezclas de 0.25/0.75 de fructanos lineales y ramificados, respectivamente mostró particular efecto sobre las células HT29. Para las células SW480 la apoptosis fue incrementada cuando los fructanos lineales estuvieron en mayor proporción (0.75/0.25). En las células sanas la disminución de la apoptosis se vio favorecida con las mezclas 1/0 fructanos lineales y ramificados y 0.5/0.5 fructanos lineales y ramificados.

Por lo tanto, las mezclas de fructanos lineales y ramificados podrían ser utilizadas para prevenir el cáncer de colon a través de la nutrición de las células sanas. Pero se requieren más estudios en humanos para poder determinar las dosis adecuadas de estos componentes que permitan prevenir el cáncer de colon.

Referencias

- Álvarez García, P., Alcántara Quintana, L. E., Ruiz Cabrera, M. A., Martínez Gutiérrez, F., González García, R., & Grajales Lagunes, A. (2023). Fructan mixtures of *Agave salmiana* and chicory exhibit *in vitro* anticancer potential in human colon cells and prebiotic activity. *Cogent Food & Agriculture*, *9*, 2196871. <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2196871>
- Arun, K. B., Madhavan, A. Reshmitha, T. R., Thomas, S., & Nisha, P. (2019). Short chain fatty acids enriched fermentation metabolites of soluble dietary fibre from *Musa paradisiaca* drives HT29 colon cancer cells to apoptosis. *Plos one*, *14*(5), 1-20 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216604>.
- Borowicki, A., Stein, K., Scharlau, D., Scheu, K., Brenner-Weiss, G., Obst, U., Hollmann, J., Lindhauer, M., Wachter, N., & Gleis, M. (2010). Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Nutrition*, *103*, 360-369. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991899>
- Castillo Andrade, A. I., Rivera Bautista, C., Godínez Hernández, C., Ruiz Cabrera, M. A., Fuentes Ahumada, C., García Chavez, E., & Grajales Lagunes A. (2018). Physiometabolic effects of *Agave salmiana* fructans evaluated in Wistar rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, *108*, 1300-1309. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.043>
- Castillo Andrade, A. I., Rivera Bautista, C., Ruiz Cabrera, M. A., Soria Guerra, R. E., Fuentes Ahumada, C., García Chávez, E., & Grajales Lagunes, A. (2019). *Agave salmiana* fructans as gut health promoters: Prebiotic activity and inflammatory response in Wistar healthy rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, *136*, 785-795. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.045>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)

- consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491-502. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Goldstein, I., Rivlin, N., Shoshana, O., Ezra, O., Madar, S., Goldfinger, N., & Rotter, V. (2013). Chemotherapeutic agents induce the expression and activity of their clearing enzyme CYP3A4 by activating. *Carcinogenesis*, 34(1), 190–198. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs318>
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 735-745. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.03.010>
- Letai, A. (2017). Apoptosis and Cancer. *Annual Review Cancer Biology*, 1, 275-294. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancer-bio-050216-121933>
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliroion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7832-7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Luo, G., Guenther, T., Gan, S. L. & Humphreys W.G. (2004). CYP3A4 Induction by Xenobiotics: Biochemistry, Experimental Methods and Impact on Drug Discovery and Development. *Current Drug Metabolism*, 5, 483-505.
- Moreno Vilet, L., García Hernández, M. H., Delgado Portales, R. E., Corral Fernández N. E., Cortez Espinosa, N., Ruiz Cabrera, M. A., & Portales Pérez, D. P. (2014). *In vitro* assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63,181-187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.039>
- Munjál, U., Gleí, M., Pool-Zobel, B.L. & Scharlau, D. (2009). Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *British Journal of Nutrition*, 102, 663–67.
- Pandurangan, A., Kumar Divya, T., Kumar, K., Dineshbabu, V., Velavan, B., Sudhandiran, G. (2018). Colorectal carcinogenesis:

- Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 10(9), 244–259. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v10.i9.244>.
- Peredo Lovillo, A., Romero Luna, H. E., & Jiménez Fernández, M. (2020). Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. *Food Research International*, 136, 109473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109473>
- Santiago-García, P. A., & López, M. G. (2014). Agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice. *Food and Function*, 5(12), 3311-3319. <https://doi.org/10.1039/c4fo00561a>
- Serban, D.E. (2014). Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and Prebiotics Cancer. *Letters*, 345(2), 258-270. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.013>
- World Health Organization. (2021). *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Wang, R., Li, Z., Liu, S., Zhang, D. (2023). Global, regional, and national burden of 10 digestive diseases in 204 countries and territories from 1990 to 2019. *Frontier Public Health*. 111061453. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1061453>.

3.3 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CURCUMINA EN MICROENCAPSULADOS DE ALGINATO CON AGAVINAS Y MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Carolina Buitrago Arias¹, Cristian Camilo Villa², Rita Martínez Velarde¹, Liliana Alamilla Beltrán³, Antonio Ruperto Jiménez Aparicio¹, Brenda Hildeliza Camacho Díaz¹ y Martha Lucía Arenas Ocampo^{1*}

RESUMEN

Los fructanos de agave (Agavinas) se utilizan habitualmente por su capacidad prebiótica como parte de sus propiedades funcionales. Las interacciones de estas moléculas y diversos biopolímeros con diferentes naturalezas y complejidades químicas han sido estudiadas para desarrollar encapsulaciones alimentarias y farmacéuticas tipo matriz con capacidad de liberación controlada. El objetivo de este trabajo fue realizar encapsulación por gelificación iónica con agavinas (Ag) y material lignocelulósico (ML) de *Agave angustifolia* Haw para la encapsulación y posterior liberación de curcumina (Cur). Se utilizó una mezcla de Ag, ML y alginato (A). La morfoestructura se determinó a partir de los parámetros de área y perímetro. La cinética de liberación evaluada mediante los modelos Ritger-Peppas y Peppas-Sahlin indicó que el proceso de liberación en la mezcla de alginato-agavinas + curcumina se produjo por difusión y no por hinchamiento de la matriz. Estos resultados indican la posibilidad de utilizar la mezcla de

¹ Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Col. San Isidro, C.P., 62731, Yautepec, Morelos, México.

*mlarenas@ipn.mx, cbuitragoa1500@alumno.ipn.mx

² Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, Carrera 15 Calle 12N, Armenia, Quindío, Colombia.

³ Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Wilfrido Massieu s/n, U. P. Adolfo López Mateos, CP 07738, Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México.

alginato-agavinas y material lignocelulósico para realizar un sistema de liberación controlada.

PALABRAS CLAVE: Encapsulación, análisis digital de imágenes, gelación iónica, fructanos, fibras.

Introducción

La encapsulación es el proceso que permite incluir un agente activo o una sustancia dentro de otra sustancia que constituye el material de la pared. La encapsulación mejora la protección de moléculas bioactivas o microorganismos, por ejemplo, antioxidantes, vitaminas, fitoesteroles, productos farmacéuticos y probióticos (Đorđević *et al.*, 2014). Esta técnica permite mejorar su estabilidad, además favorece la liberación del contenido en el lugar específico (Bourbon *et al.*, 2016).

Con respecto a la liberación controlada de moléculas biológicamente activas a través de vehículos basados en nuevos biomateriales, se han realizado estudios innovadores utilizando moléculas biodegradables y biocompatibles. Estas moléculas liberan compuestos que pueden modificarse químicamente y cambiar sus propiedades fisicoquímicas para generar nuevos materiales estructurados para aplicaciones biomédicas y alimentarias (Martins *et al.*, 2017; Ray *et al.*, 2015). Entre las moléculas bioactivas que han suscitado gran interés se encuentra la curcumina, una molécula obtenida de la cúrcuma (*Curcuma longa*) y conocida por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, inflamatorias y anticancerígenas (Jiang *et al.*, 2020). Sin embargo, existen muchas limitaciones para las aplicaciones de la curcumina en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria, la principal es su baja solubilidad en agua, que dificulta su biodegradabilidad; así mismo, la curcumina es muy susceptible a la degradación ácida y a la fotodegradación (Jiang *et al.*, 2020). La principal estrategia para evitar estos problemas consiste en utilizar técnicas de encapsulación, especialmente empleando materiales biocompatibles (Hu & Luo, 2021).

Algunos biopolímeros ampliamente estudiados, como la celulosa, el almidón y los alginatos, se utilizan actualmente para la liberación controlada de compuestos bioactivos debido a que sus estructuras químicas pueden interactuar con una amplia gama de compuestos hidrófilos e hidrófobos (Fertah *et al.*, 2015). Por otro lado, tenemos a las agavinas, las cuales son un tipo de fructanos obtenidos de plantas del género de Agave; son macromoléculas de reserva de estas plantas y están constituidas por cadenas monoméricas de fructosa unidas por enlaces de tipo β (2-1) y β (2-6) y contienen una glucosa interna o terminal (Lopez *et al.*, 2003). La capacidad prebiótica de los fructanos y su idoneidad como modificadores de textura en matrices alimentarias han sido ampliamente estudiadas (Buitrago-Arias *et al.*, 2021; Velázquez-Martínez *et al.*, 2014). Sin embargo, pocos estudios se han ocupado de la difusión de este tipo de fructooligosacáridos como coadyuvantes para la formación de material de pared.

Las plantas de agaves también están compuestas por material lignocelulósico (ML), celulosa, hemicelulosa y lignina. En las últimas décadas ha crecido el interés por la utilización de materiales lignocelulósicos de valor añadido para aplicaciones médicas e industriales, como portadores de compuestos bioactivos. Debido a su capacidad estabilizadora y filmógena, se requiere estudiar estas macromoléculas para su uso como material de pared (Iqbal *et al.*, 2013). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las agavinas y el material lignocelulósico de agave en la formación de un material de pared mediante gelación iónica y la difusión de la curcumina (Cur) a partir de este material. Además, este estudio analizó la eficiencia de encapsulación (EE) y los cambios morfoestructurales de los microencapsulados.

Materiales y métodos

Las agavinas extraídas de *Agave angustifolia* Haw. se obtuvieron mediante el proceso descrito en la patente MX/a/2015/016512. El material lignocelulósico se obtuvo del bagazo de agave residual del proceso anterior, donde el material fue secado a 40°C durante 48h (Hernández *et al.*, 2018). Se utilizó alginato de sodio y curcumina comercial.

Espectroscopia infrarroja de reflexión total atenuada-transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Los grupos funcionales de los materiales se determinaron mediante ATR-FTIR. Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu (modelo IRAffinity, Shimadzu, Japón) equipado con un accesorio ATR. En el análisis se consideró la región 400-4500 cm^{-1} , y se realizaron 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} .

Preparación de los microencapsulados y estudio de la morfoestructura

Los microencapsulados se formaron mediante la técnica de gelificación iónica por extrusión por goteo siguiendo la metodología de Buitrago-Arias (2017). Se utilizó alginato (1%), agavinas (5%), material lignocelulósico (0,5%) y curcumina (1%) (p/p) para hacer las siguientes mezclas de prueba: alginato (A), alginato + curcumina (ACur), alginato agavinas + curcumina (AAgCur) y AAgLM + Cur. El análisis morfométrico de los microencapsulados se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico estereoscópico (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Tokio, Japón) equipado con una cámara digital (Buitrago-Arias, 2017).

Eficacia de la encapsulación

Se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) a las diferentes mezclas (alginato + curcumina, alginato agavinas + curcumina, y AAgLM + Cur), se siguió la metodología propuesta por Song *et al.* (2012). El porcentaje de EE se calculó utilizando la Ecuación 1:

$$\%EE = \frac{\text{masa curcumina en perlas}}{\text{masa curcumina inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Cinética de liberación

El estudio de las cinéticas se realizó siguiendo la metodología de Song *et al.* (2012). Se tomaron los microencapsulados liofilizados (100 mg) en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2). A intervalos de tiempo constantes, se tomaron volúmenes de 1 mL con reposición de volumen medio para el análisis espectrométrico de curcumina utilizando un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 420 nm. Se trazaron los cambios en las concentraciones de curcumina y se ajustaron al modelo (Ecuación 2 y 3) propuesto por Ritger y Peppas y Peppas-Sahlin (Flores & Kong, 2017).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

M_t/M_∞ = fracción de soluto liberada, k = constante de liberación, n = mecanismo de difusión y t = tiempo.

Asimismo, la cinética de liberación se ajustó al modelo propuesto por Peppas-Sahlin (Ecuación 3).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

k_1 y k_2 representan las constantes de difusión y erosión, respectivamente, y m es el exponente de difusión.

El coeficiente de difusión (D) de la curcumina desde los microencapsulados se calculó según Agnihotri *et al.* (2006) usando la Ecuación 4.

$$D = \left(\frac{R\theta}{6M_\infty} \right)^2 \pi \quad \text{Ecuación 4}$$

donde R es el radio de las perlas, M^∞ es la cantidad total de curcumina en las perlas y θ representa la pendiente de la fase lineal de M_t/M^∞ frente a $t^{1/2}$.

Análisis estadístico

Los parámetros morfométricos (área, perímetro y diámetro de feret) obtenidos a partir de 30 microesferas evaluadas en diferentes condiciones de pH se analizaron estadísticamente utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20 (IBM, EE.UU.). Se realizó un ANOVA unidireccional utilizando estadísticos de contraste con un intervalo de confianza del 95%.

Resultados y discusión

Espectroscopia infrarroja de reflexión total atenuada-transformada de Fourier (ATR-FTIR)

El espectro FTIR de la curcumina (Figura 1a) muestra un pico a 2974 cm^{-1} debido a los enlaces C-H presentes en los anillos aromáticos y otro pico a 802 cm^{-1} debido a los enlaces C-H de los grupos aromáticos (Dhakal *et al.*, 2019). El espectro del material lignocelulósico (Figura 1b) mostró un pico a 2912 cm^{-1} , típico de los enlaces C-H de las cadenas alifáticas de la celulosa y la hemicelulosa. Cerca de 1715 cm^{-1} se obtuvieron señales débiles correspondientes al estiramiento C=O de las hemicelulosas. Los picos a 1311 y 1230 cm^{-1} se atribuyen al débil estiramiento del enlace C-O y del grupo arilo en la lignina, respectivamente. El pico intenso a 1018 cm^{-1} corresponde a los enlaces β -1,4-glicosídicos que unen unidades de la glucosa en la celulosa y la hemicelulosa. El espectro de las agavinas (Figura 1c) mostró una banda de absorción en $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, que se debe al estiramiento de los grupos O-H; la región $2900\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ indica el estiramiento de los enlaces C-H de los carbohidratos (Velázquez-Martínez *et al.*, 2014)

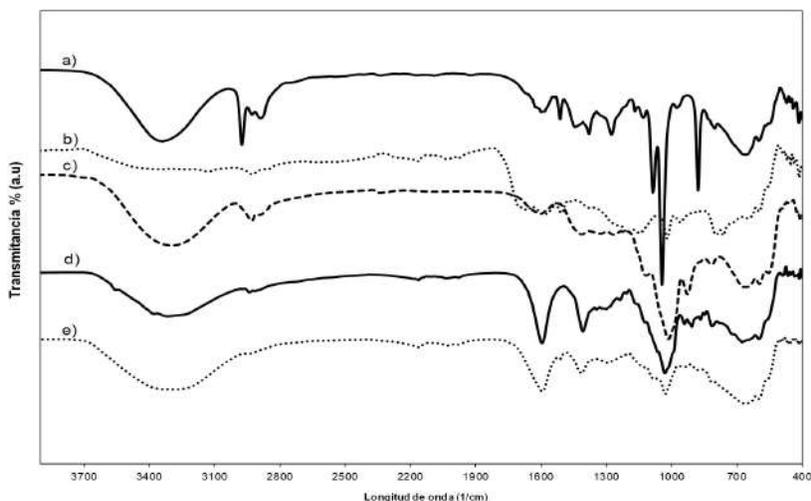


Figura 1. Espectros FTIR a) curcumina, b) material lignocelulósico, c) agavinas, d) alginato, e) perlas encapsuladas

La región espectral $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ muestra picos atribuidos al estiramiento de los enlaces C-C y C-O y a la flexión de los enlaces C-O-H y C-O-C, que son característicos de diversos oligosacáridos y polisacáridos (Pintor-Jardines *et al.*, 2018). El espectro de la Figura 1 e corresponde a un encapsulado liofilizado y muestra un cambio en la intensidad del pico alrededor de 1593 cm^{-1} , que se debe a la interacción de los enlaces C-C de diferentes moléculas.

Evaluación morfométrica de los microencapsulados

Para las agavinas, alginato y material lignocelulósico se obtuvieron diferentes tamaños de partícula de $10,79\text{ }\mu\text{m}$, $3,65\text{ }\mu\text{m}$ y $177\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente, lo cual indicó la heterogeneidad del material. El análisis morfométrico mostró que los microencapsulados de alginato + agavinas tenían la menor área ($0,21\text{ mm}^2$) y un perímetro pequeño ($0,71\text{ mm}$); por lo tanto, estos microencapsulados eran más compactos que las de sólo A, que tenían mayor área ($0,29\text{ mm}^2$). Los parámetros de factor elíptico para cada muestra ($1,0665$; $1,2011$ y $1,1011$) exponen

que la Cur no afecta a la forma de los microencapsulados. La forma de los microencapsulados se vio afectada por la adición de alginato, dando lugar a formas menos esféricas. Este hallazgo indica que la conformación estructural de los microencapsulados cambió cuando el alginato interactuó con agavinas y con material lignocelulósico.

Eficiencia de encapsulación

Diferentes microencapsulados alginato+ curcumina (A + Cur), alginato agavinas+ curcumina (AAg + Cur), y la mezcla de alginato agavinas y material lignocelulósico (AAgLM + Cur) (Fig. 2) tuvieron altas concentraciones de curcumina encapsulado (87,98%, 76,17%, y 70,68%, respectivamente) debido a la mayor afinidad de la matriz por la curcumina resultante de la mezcla entre el alginato y las agavinas (AAg). Según Volic *et al.* (2018), este efecto se produce porque el alginato tiene una formación de poros que puede atrapar gotas de aceite; estos obtuvieron una EE entre el 75% y el 80% para encapsulados compuestos de alginato y proteína de soja.

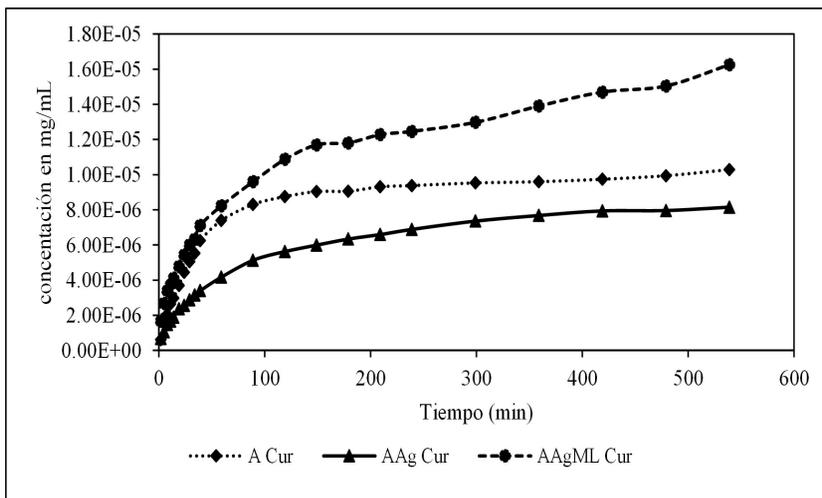


Figura 2. Cinética de liberación de microencapsulados de curcumina A+Cur, AAg+ Cur y AAgML+Cur

Los valores obtenidos para la cinética de liberación ajustada a los modelos Ritger-Peppas y Peppas-Sahlin, según el primer modelo, cuando $n = 0.45$ indica que la liberación de un compuesto bioactivo se produce por difusión, mientras que si $n = 0.89$, la liberación se produce por un fenómeno de hinchamiento que se designa como caso de transporte II. Cuando n se sitúa entre 0.45 y 0.89, el comportamiento de liberación del compuesto puede considerarse como la superposición de los dos fenómenos y se denomina transporte anómalo (Flores & Kong, 2017; Song *et al.*, 2012). De acuerdo con los valores obtenidos para n y k para las mezclas, todas las muestras mostraron un comportamiento fickiano; sin embargo, la capacidad difusiva de las matrices se vio influida por la presencia de fructanos ($k = 0,827$) con un porcentaje de curcumina liberado menor que en los otros casos, lo que indica una matriz con un mayor grado de entrecruzamiento (AAg + Cur).

En función de los valores de n , tanto las mezclas AAg + Cur como AAgML + Cur presentaban matrices más reticuladas lo que, a su vez, en el caso de la mezcla AAg + Cur ($n = 0,439$), correspondía a matrices con mejores características de solubilidad y, por tanto, capacidad para regular la velocidad de liberación (Song *et al.*, 2012). Los valores de k obtenidos a partir del modelo de Ritger-Peppas indicaron la tasa de liberación de Cur, presentando una tasa mayor ($k = 0,306$) en el caso de AAgML + Cur que en el caso de AAg + Cur ($k = 0,827$). Estos resultados confirman la posibilidad de utilizar la mezcla AAg + C para un sistema de liberación controlada. Además, k_1 fue superior a k_2 para los microencapsulados de alginato + curcumina, lo que indica que el transporte Fickiano es el principal impulsor de la liberación de la curcumina. Al añadir agavinas, este comportamiento cambió y k_1 se hizo menor que k_2 , indicando que el proceso de liberación estaba gobernado principalmente por la erosión del encapsulado y no por la difusión de la curcumina.

Los índices de correlación del modelo Peppas-Sahlin fueron superiores a los del modelo Ritger-Peppas, lo que implica que el primero se ajustaba mejor al comportamiento de los materiales. Además, se observó que la liberación de curcumina era más lenta en el caso de

los microencapsulados AAg + Cur que en el caso de los microencapsulados AAgML + Cur, debido al mayor grado de reticulación y de formación de poros, respectivamente.

Conclusiones

La capacidad difusiva de la matriz, así como la eficiencia de encapsulación, mejoraron en presencia de las agavinas y el material lignocelulósico. La mezcla favoreció la liberación controlada de curcumina por difusión y no por hinchamiento. El resultado de usar la mezcla de Agavinas y el material lignocelulósico de bagazo de Agave, dieron lugar a un microencapsulado de alginato con mayor eficacia y velocidad de liberación de curcumina.

Referencias

- Agnihotri, S. A., Jawalkar, S. S., & Aminabhavi, T. M. (2006). Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *63*(3), 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.12.008>
- Bourbon, A. I., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2016). Encapsulation and controlled release of bioactive compounds in lactoferrin-glycomacropeptide nanohydrogels: Curcumin and caffeine as model compounds. *Journal of Food Engineering*, *180*, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.016>
- Buitrago-Arias, C., Londoño-Moreno, A., Avila-Reyes, S. V., Arenas-Ocampo, M. L., Alamilla-Beltran, L., Jimenez-Aparicio, A. R., & Camacho-Diaz, B. H. (2021). Evaluation of the fermentation of acetylated agave fructans (agavins), with *Saccharomyces boulardii* as a probiotic. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *20*(3), 1–13. <https://doi.org/10.24275/rmiq/poly2533>
- Buitrago-Arias C. (2017). *Estudio de un sistema acarreador constituido por fructanos y material lignocelulósico para el transporte de compuestos bioactivos* [tesis maestría, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio DSpace. <https://tesis.ipn.mx>

- Dhakal, S., Schmidt, W. F., Kim, M., Tang, X., Peng, Y., & Chao, K. (2019). Detection of additives and chemical contaminants in turmeric powder using FT-IR spectroscopy. *Foods*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/foods8050143>
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2014). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452 - 490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>
- Fertah, M., Belfkira, A., Taourirte, M., & Brouillette, F. (2015). Controlled Release of Diclofenac by a New System Based on a Cellulosic Substrate and Calcium Alginate. *BioResources*, 10(1950), 5932–5948.
- Flores, F. P., & Kong, F. (2017). In Vitro Release Kinetics of Microencapsulated Materials and the Effect of the Food Matrix. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025720>
- Hernández, Y. R., García Serrano, L. A., Maruri, D. T., Jiménez Aparicio, A. R., Camacho Díaz, B. H., & Arenas Ocampo, M. L. (2018). Optimization of the microwave-assisted ethanosolv extraction of lignocellulosic compounds from the bagasse of *Agave angustifolia* Haw using the response methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(13), 3533-3540.
- Hu, Q., & Luo, Y. (2021). Chitosan-based nanocarriers for encapsulation and delivery of curcumin: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.216>
- Iqbal, H. M. N., Kyazze, G., & Keshavarz, T. (2013). Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. *BioResources*, 8(2), 3157–3176. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.3157-3176>
- Jiang, T., Liao, W., & Charcosset, C. (2020). Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: A review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. *Food Research International*, 132(October 2019), 109035. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109035>

- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835–7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>
- Martins, E., Poncelet, D., Rodrigues, R. C., & Renard, D. (2017). Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation*, 34(8), 754–771. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495>
- Pintor-jardines, A., Arjona-Román, J. L., Totosaus-Sánchez, A., Severiano-Pérez, P., González-González, L. R., & Escalona-Buendía, H. B. (2018). The influence of agave fructans on thermal properties of low-fat, and low-fat and sugar ice cream. *LWT - Food Science and Technology*, 93(March), 679–685. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.060>
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2015). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Song, S., Zhang, L., Qian, Y., Luo, E., & Wang, Z. (2012). The Release Rate of Curcumin from Calcium Alginate Beads Regulated by Food Emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4388–4395. <https://doi.org/10.1021/jf3006883>
- Velázquez-Martínez, J. R., González-Cervantes, R. M., Hernández-Gallegos, M. A., Campos Mendiola, R., Jiménez Aparicio, A., & Arenas Ocampo, M. L. (2014). Prebiotic potential of Agave angustifolia haw fructans with different degrees of polymerization. *Molecules*, 19(8), 12660–12675. <https://doi.org/10.3390/molecules190812660>
- Volic, M., Pajic-Lijakovic, I., Djordjevic, V., Knezevic-Jugovic, Z., Pecinar, I., Stevanovic-Dajic, Z., Hadnadjev, M., & Bugarski, B. (2018). Alginate / soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. *Carbohydrate Polymers*, 200(January), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.033>

3.4 ENCAPSULACIÓN DE *Saccharomyces boulardii* CON AGAVINAS: UN NUEVO ENFOQUE DEL USO DE BIOMATERIALES DE *Agave angustifolia* HAW

Liliana Kelly Vigil Cuate^{1*}, Sandra Victoria Ávila Reyes², Brenda Hildeliza Camacho Diaz¹, Roberto Campos Mendiola¹, Antonio Ruperto Jiménez Aparicio¹, Perla Osorio Diaz¹, Paz Soledad Robert Canales³ y Martha Lucia Arenas Ocampo^{1*}

RESUMEN

Los fructanos de agave o agavinas han sido utilizados como material pared para encapsular probióticos como *Saccharomyces boulardii* por técnicas como gelación iónica; sin embargo, el secado por aspersión es el método de encapsulación más utilizado en la industria alimentaria por su flexibilidad, bajo costo, alto rendimiento y alta viabilidad en la encapsulación de probióticos. En el presente trabajo se utilizaron agavinas de *Agave angustifolia* Haw para encapsular *S. boulardii* por la técnica de secado por aspersión. Se utilizó un diseño factorial 2³ con dos concentraciones de agavinas (5 y 10%) y tres temperaturas de entrada (70, 90 y 110 °C) para realizar la encapsulación. Las cápsulas obtenidas se caracterizaron fisicoquímicamente determinando el contenido de humedad y actividad de agua, la caracterización morfológica se realizó utilizando un microscopio electrónico de alta resolución (FE-SEM) y se determinó la viabilidad de *S. boulardii* antes y después de la encapsulación utilizando el método de cultivo de microgota

¹ Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN), Departamento de bioquímica, Km 6 carretera Yauatepec-Jojutla, Col. San Isidro, Yauatepec, Morelos, México 62731. *mlarenas@a.ipn.mx

² CONACyT - Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN), Departamento de bioquímica, Km 6 carretera Yauatepec-Jojutla, Col. San Isidro, Yauatepec, Morelos, México 62731.

³ Universidad de Chile, Dr. Carlos Lorca Tobar 964, Independencia, Región Metropolitana, Santiago de Chile, Chile.

en placas de agar YPD. Los encapsulados obtenidos mostraron un tamaño de partícula promedio entre 1.74 μm - 3.9 μm con forma esférica, superficie irregular y sin fracturas o grietas, lo cual indica que las agavinas producen una pared que no es frágil y mantiene la viabilidad de *S. boulardii*. En conclusión, utilizando agavinas como material pared, se obtuvieron encapsulados con tamaño de partícula menores a 5 μm que aseguran la viabilidad de *S. boulardii* a una temperatura de entrada menor a 110° C y con un rendimiento entre 63–77 %, mayor al obtenido con otro tipo de materiales de encapsulación (19- 59%) como proteínas o gomas.

PALABRAS CLAVE: Prebiótico, probiótico, FE-SEM, Secado por aspersión

Introducción

Los fructanos de agave o agavinas, como han sido denominadas por López *et al.* (2003), son polisacáridos ramificados de unidades de fructosa y una unidad de glucosa. Se consideran como ingredientes de alimentos funcionales por ejercer una función prebiótica para la microbiota y el efecto benéfico en procesos metabólicos en humanos y animales, mejorando la salud y reduciendo el riesgo de padecer algunas enfermedades metabólicas no transmisibles (Espinosa-Andrews & Uriás-Silvas, 2021; Alvarado-Jasso, 2020). Además de considerar a los fructanos como un componente en la formulación de matrices alimentarias, el polvo obtenido por secado por aspersión se ha caracterizado previamente y utilizado como material pared en procesos de encapsulación de microorganismos. Entre los métodos de encapsulación más utilizados se encuentran aquellos por gelación iónica y secado por aspersión (Chávez-Falcón *et al.*, 2022; Fabela-Morón *et al.*, 2015; Ávila-Reyes *et al.*, 2014).

La encapsulación es un proceso en el cual un componente o agente activo es contenido en el interior de otra sustancia que forma una película alrededor protegiéndolo de los factores ambientales (Sando-

val-Peraza *et al.*, 2016). La encapsulación permite controlar la eliminación de sabores indeseables, reducir la volatilidad, higroscopicidad y reactividad incrementado la estabilidad de los productos. Existen dos tipos de procesos de encapsulación: químicos y mecánicos. Los procesos químicos abarcan las técnicas de coacervación, cocrystalización, atrapamiento por liposomas, incompatibilidad polimérica, polimerización interfacial, inclusión molecular y gelificación iónica. Mientras que las técnicas que pertenecen a los procesos mecánicos son el secado por aspersión, secado por congelamiento/enfriamiento y extrusión (Parra Huertas, 2010).

Los microorganismos probióticos son benéficos para la salud, ya que mejoran el equilibrio de la microbiota intestinal nativa, junto a los prebióticos, que son considerados como un sustrato para los microorganismos en el colon, brindan un beneficio al huésped. Su eficacia está relacionada con su viabilidad, dosis de administración, estabilidad metabólica en matrices alimentarias y la habilidad de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales, puesto que durante la digestión y el almacenaje suele haber pérdida de la viabilidad. Por lo tanto, la encapsulación puede ser una solución para mantener la viabilidad durante estos procesos (Rajam & Subramanian, 2022; Arslan *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2014).

La levadura *Saccharomyces boulardii* es un probiótico comúnmente utilizado para tratar enfermedades gastrointestinales; sin embargo, la viabilidad del microorganismo disminuye durante algunos procesos alimentarios, por lo que se han utilizado distintos métodos de encapsulación que mejoren su viabilidad durante la adición del probiótico a distintas matrices alimentarias (Lazo-Vélez *et al.*, 2018; Arslan *et al.*, 2015). A través del método de encapsulación de gelación iónica se han utilizado mezclas de materiales como alginato, inulina y mucilago de nopal para adicionar a *S. boulardii* en productos lácteos (Chávez-Falcón *et al.*, 2022; Zamora-Vega *et al.*, 2012). También se han utilizado otras mezclas donde incluyen alginato, agavinas y proteína de suero de leche como material encapsulante, observando que el uso de más de un material encapsulante como las agavinas y la proteína de suero de leche mejoran, en conjunto, la viabilidad de *S. boulardii* cuando se expone a un

sistema gastrointestinal *in vitro* (Chávez-Falcón *et al.*, 2022; Zamora-Vega *et al.*, 2012). En diversos trabajos se ha reportado que el método de secado por aspersión ha sido eficiente para que la viabilidad de *S. boulardii* no disminuya en distintos materiales pared utilizados (goma arábica, gelatina, almidón modificado, proteína de suero de leche concentrada, maltodextrina o proteína de chícharo), sin embargo, es la estabilidad del material pared la condición más importante para preservar las características del compuesto encapsulado, ya que influye directamente sobre las condiciones de almacenamiento y en la interacción al interior del núcleo. No obstante, sí se ha observado un incremento en la viabilidad durante la exposición a un sistema gastrointestinal *in vitro* cuando existe un proceso de encapsulación (Arslan *et al.*, 2015).

Por esta razón, la técnica de secado por aspersión es una de las técnicas más utilizadas en la industria alimentaria, además de ser económica, flexible, tener un alto rendimiento y ser más fácil de escalar que otras técnicas (Parra Huertas, 2010; Sandoval-Peraza *et al.*, 2016). Otro punto es que la exposición a altas temperaturas es por tiempos muy cortos (2-5 s), obteniendo microcápsulas estables, facilitando su aplicación en la industria alimentaria para la encapsulación de probióticos (Arslan *et al.*, 2015; Chandralekha *et al.*, 2016). Por lo anterior, el objetivo en este trabajo fue evaluar a los fructanos de *Agave angustifolia* Haw como encapsulante de *S. boulardii* por secado por aspersión, utilizando agavinas como material pared.

Materiales y métodos

Materia prima

Los fructanos de agave o agavinas utilizados se obtuvieron de *Agave angustifolia* Haw. (Patente mx/a/2015/016512) en planta piloto en CEPROBI-IPN. Las agavinas se esterilizaron mediante rayos gamma a 4 KGy (ICN-UNAM). Se utilizó una cepa comercial de *S. boulardii* (CNCM I-745; Floratil, BIOCOCODEX).

Activación y recuperación de *Saccharomyces boulardii*

La cepa comercial de *S. boulardii* se reactivó incubando el contenido de una capsula de 1 g en 50 mL de medio líquido caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose) (glucosa 10g/L, peptona de caseína 5g/L, extracto de levadura 5g/L, cloruro de sodio 0.5 g/L) por 24 h a 37°C a 200 rpm. Del medio reactivado se sembraron 5 mL en 95 mL de caldo YPD estéril (pase al 5%) y se incubó por 24 h nuevamente a 37° C y 200 rpm. Se realizó una curva de crecimiento del microorganismo para estimar el tiempo de incubación de los medios de cultivo e identificar la población óptima de acuerdo con la etapa de crecimiento al momento de realizar la encapsulación. Para aislar el concentrado celular, los 100 mL del medio reactivado YPD se distribuyeron en tubos de centrifuga, previamente pesados y esterilizados, dentro de una campana de flujo laminar. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se retiró por decantación para obtener el concentrado celular en forma de botón.

Para la recuperación del microorganismo en el botón se añadió un volumen conocido de un mL en uno de los tubos, esta suspensión se pasó cada vez al siguiente tubo, hasta tener todo el concentrado celular de todos los tubos en uno solo. Se registró el peso final de la suspensión (residuo recuperado) y a este se le restó el peso de agua que se adicionó para resuspender el microorganismo. El peso se utilizó en la conversión de recuento inicial de UFC/mL en la suspensión a UFC/g en el polvo y en el rendimiento de encapsulación (Chávez-Falcón *et al.*, 2022; Ávila-Reyes *et al.*, 2016).

Encapsulación por secado por aspersión de *Saccharomyces boulardii*

La encapsulación de *S. boulardii* se llevó a cabo en el Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas de la Universidad de Chile (Santiago de Chile, Chile). Las formulaciones para obtener los encapsulados se realizaron de acuerdo con las condiciones descritas en el Cuadro 1. Se

prepararon dispersiones de agavinas estériles (5 y 10% p/p) en agua estéril a temperatura ambiente (25°C), se adicionó el botón celular de *S. boulardii* y se alimentó a un mini secador por aspersión B-290 (BÜCHI, Suiza), manteniendo la solución en agitación constante para mantener la dispersión homogénea. Las condiciones del secador por aspersión fueron las siguientes: flujo de alimentación de 6 mL/min, flujo de aire de 600 L/h, presión de atomización de 20 psi y boquilla de atomización neumática de dos vías (Farías-Cervantes *et al.*, 2017; Chandralekha *et al.*, 2016; Arslan *et al.*, 2015; Duongthingoc *et al.*, 2013). Para mantener la esterilidad en el equipo se usó una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) para lavar las mangueras. Antes de iniciar el secado de las dispersiones con el microorganismo, se hizo pasar agua estéril durante el acondicionamiento en el secador. Los polvos obtenidos se colocaron en bolsas estériles y herméticas para evitar la humectación.

Cuadro 1. Tratamientos para obtener microcápsulas de *Saccharomyces boulardii* por secado por aspersión

Tratamiento	Temperatura de entrada (°C)	Sólidos (%)
AF - 70 - 5	70	5
AF - 70 - 10	70	10
AF - 90 - 5	90	5
AF - 90 - 10	90	10
AF - 110 - 5	110	5
AF - 110 - 10	110	10

AF = Fructanos de agave

Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* en los encapsulados

La viabilidad de *S. boulardii* en las microcápsulas se determinó diluyendo 100 mg de microcápsulas en 900 µL de PBS (NaCl 8g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 2H₂O 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L). Se prepararon diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁶, posteriormente, por el método de microgota de método de Miles y Misra (1938), se tomó una alícuota de 10 µL y se

sembró en cajas petri con agar-YPD, las cuales se incubaron por 24 h a 37° C. Se contaron las colonias que crecieron en la caja petri después del periodo de incubación y utilizando la Ecuación 1 se determinó la cuenta viable de *S. boulardii*, la cual se reportó antes del proceso de secado como UFC/mL, una vez que el botón recuperado de microorganismos (m.o.) en la centrifugación se inoculó en las diferentes dispersiones. De la misma forma, se reportó como UFC/g después del proceso de encapsulación (en el polvo obtenido) (Ecuación 2). Así mismo, se determinó la reducción microbiana de *S. boulardii* antes y después del proceso de encapsulación como se muestra en la Ecuación 3 (Chávez-Falcón *et al.*, 2022; Ávila-Reyes *et al.*, 2016).

$$\text{Viabilidad de } S. \text{boulardii} = \text{Log} ((N + D) 100) \quad \text{Ecuación 1}$$

N= Colonias contadas

D= Factor de dilución

La conversión de UFC/mL a UFC/g en los sólidos secos se obtuvieron utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{g} = \frac{UFC}{mL \text{ solución}} + \frac{1}{\rho} + \frac{g \text{ solución}}{g \text{ sólidos secos}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

g sólidos secos = g sólidos en la dispersión + g del botón de m.o. en la centrifugación

UFC/mL solución = recuento de m.o. en la dispersión

ρ = densidad de la dispersión

$$\text{Reducción microbiana} = \text{Log} N_0 - \text{Log} N \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

N_0 = Población microbiana de UFC de *S. boulardii* después del proceso encapsulación

N = Población microbiana de UFC de *S. boulardii* antes del proceso de encapsulación

Microestructura de los encapsulados de *Saccharomyces boulardii*

Se utilizó Microscopía Electrónica de Barrido de alta resolución FE-SEM (Inspect F50, FEI, Holanda) para determinar la morfología y estructura de los encapsulados. Las muestras se colocaron sobre un portamuestras de aluminio con cinta conductora de carbono, se recubrieron con una película de oro de 10 nm mediante un equipo para recubrir por pulverización catódica Cressington (TEDPELLA, modelo 108) acoplado a un controlador de espesor MTM 20 Cressington. Para la obtención de imágenes se utilizó un detector de electrones secundario (ETD) con un voltaje de 2kV. Las micrografías se analizaron con el software IMAGEJ para determinar el tamaño de partícula de los encapsulados.

Rendimiento de encapsulación

Se calculó el rendimiento de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión, como se indica en la Ecuación 4.

$$\text{Rendimiento} = \frac{(W_{\text{agavinas}} + W_{\text{botón celular}})}{W_{\text{microcapsulas}}} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

W = peso en gramos

Propiedades fisicoquímicas de los encapsulados

El contenido de humedad se determinó utilizando un analizador de humedad por infrarrojo MOC-120H (Shimadzu, Kioto, Japón). La

actividad de agua se determinó a una temperatura de 20 ± 0.3 °C usando un termohigrómetro Hygropalm HP23-AW-A (Rotronic, Bassersdorf, Switzerland).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) para las pruebas de comparación múltiple de medias. Se utilizó el software de estadística descriptiva SPSS Statistics 25 (IBM, N.Y., USA). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm error estándar. Las diferencias significativas entre las medias se compararon mediante la metodología de Tukey ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica de los encapsulados de *Saccharomyces boulardii*

Diversos autores han mencionado las propiedades prebióticas de los fructanos, así mismo, el objetivo de encapsular con este tipo de sustancias a compuestos bioactivos es lograr que se asegure la estabilidad del compuesto encapsulado, para este estudio el microorganismo probiótico *S. boulardii*. Los fructanos han demostrado ser un buen material pared ayudando a preservar y prolongar la viabilidad de microorganismos probióticos al ser un substrato adecuado hasta que logren establecerse en el sitio de acción para el que han sido destinados (Ceja-Medina *et al.*, 2020; Farias-Cervantes *et al.*, 2017; Ortiz-Basurto *et al.*, 2017). Para la evaluación de los encapsulados se utilizaron dos concentraciones (5 y 10%) de fructanos de *Agave angustifolia* Haw. como material pared para encapsular a *S. boulardii*, y tres temperaturas de entrada (70, 90 y 110°C).

Con la finalidad de asegurar la estabilidad microbiológica en las micropartículas, diversos autores mencionan que estas deben tener una actividad de agua (a_w) entre 0.15 - 0.30. En el caso de las agavinas en

polvo, estas deben mantener una a_w por debajo de 0.33 para mantener las características de fluidez del polvo y evitar su aglomeración. Por otra parte, para asegurar la estabilidad de los encapsulados durante el almacenamiento, se ha sugerido que el contenido de humedad se encuentre en valores de 4% a 5% (Espinosa-Andrews & Urías-Silvas, 2012; Arslan *et al.*, 2015).

En el Cuadro 2 se observa que todos los tratamientos cumplieron con las especificaciones recomendadas para asegurar la estabilidad microbiológica y de almacenamiento de los encapsulados. Específicamente los tratamientos AF90-5, AF-90-10 y AF-110-10 están en el intervalo de a_w que asegura la estabilidad microbiológica y fisicoquímica de los encapsulados durante su almacenamiento.

Cuadro 2. Propiedades fisicoquímicas de encapsulados de *Saccharomyces boulardii*

Tratamiento	Actividad de agua (a_w)	Humedad (%)
AF - 70 - 5	0.3327±0.013 ^d	3.01±0.10 ^c
AF - 70 - 10	0.3447±0.001 ^d	2.53±0.11 ^{bc}
AF - 90 - 5	0.294±0.007 ^{bc}	2.04±0.40 ^{ab}
AF - 90 - 10	0.2767±0.013 ^{ab}	1.97±0.34 ^{ab}
AF - 110 - 5	0.3187±0.008 ^{cd}	1.88±0.11 ^a
AF - 110 - 10	0.2627±0.012 ^a	1.58±0.05 ^a

Los valores son la media ± error estándar, $n = 3$. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). AF = Fructanos de agave; 5 y 10 = % sólidos; 70, 90 y 110 = Temperatura de entrada al secador.

Se observó un efecto significativo de la temperatura de entrada del aire en el contenido de humedad y a_w de los encapsulados, de tal manera que al aumentar la temperatura de entrada se obtuvieron polvos con un menor contenido de humedad y a_w final. Sin embargo, la concentración de agavinas sólo tuvo efecto significativo en la a_w final de los tratamientos a 90 °C y 110 °C. Este resultado puede deberse a que las agavinas por su estructura ramificada y grupos OH- disponibles son altamente higroscópicas, teniendo gran interacción con las moléculas de agua. Además, a nivel molecular, las agavinas tienen moléculas multicapa que se comportan como agua libre teniendo mayor afinidad por esta (Espinosa-Andrews & Rodríguez-Rodríguez, 2015).

guez, 2018). Por lo tanto, al haber mayor cantidad de agavinas existe una mayor cantidad de moléculas y, a su vez, de liberación de agua de estas. Por lo que, a pesar de que a altas temperaturas se asegura la estabilidad microbiológica y la conservación de los encapsulados durante el almacenamiento, la temperatura y la humedad tienen un efecto negativo en la viabilidad de *S. boulardii*.

Encapsulación por secado por aspersión de *Saccharomyces boulardii*

El probiótico *S. boulardii* es una levadura que tiene una temperatura óptima de crecimiento a 37°C y una viabilidad del 65% a una exposición de 1 hora a 52° C (Ávila-Reyes, 2016). Debido a su importancia probiótica y sensibilidad a temperaturas altas es que se han buscado soluciones (como la encapsulación) para incrementar su viabilidad y poder adicionarlo a alimentos que requieran procesos de temperaturas altas (Pais *et al.*, 2020; Lazo Vélez *et al.*, 2018). En la encapsulación por gelación iónica de *S. boulardii* utilizando agavinas de *Agave angustifolia* Haw. y proteína de suero de leche. Chávez-Falcón *et al.* (2022) reportaron la obtención de microcápsulas con un mayor porcentaje de viabilidad cuando se adicionaban agavinas (en cualquier porcentaje) al suero de leche. Así mismo, se ha observado que el uso de prebióticos para encapsular probióticos mejora su viabilidad al continuar con su efecto prebiótico al funcionar como sustrato (Ávila Reyes *et al.*, 2014; Zamora Vega *et al.*, 2012).

La FAO/OMS reportan que un alimento probiótico debe tener una población microbiana de 7 a 8 Log UFC/g de producto para obtener un efecto benéfico (FAO/OMS, 2002). En el Cuadro 3 se presentan los resultados de la viabilidad de los encapsulados de *S. boulardii* para los diferentes tratamientos estudiados. Se alcanzaron densidades poblacionales de 1x10⁸ UFC/g de cápsulas y pérdidas de la viabilidad desde 0.3 hasta 3 ciclos logarítmicos, los cuales disminuyeron proporcionalmente con el aumento de la temperatura de entrada.

Cuadro 3. Viabilidad y rendimiento de *Saccharomyces boulardii* en los encapsulados obtenidos por secado aspersion

Tratamiento	Viabilidad celular		Reducción logarítmica microbiana (Log N ₀ – Log N)	Rendimiento de encapsulación (%)
	Población antes del secado N ₀ (UFC/g)	Población después del secado N (UFC/g)		
AF - 70 - 5	1.15x10 ^{8a}	6.00x10 ^{7a}	0.30±0.08	68.07
AF - 70 - 10	1.10x10 ^{8a}	1.7x10 ^{7a}	0.80±0.06	77.21
AF - 90 - 5	1.13x 10 ^{8a}	5.00x10 ^{7a}	0.42±0.12	65.78
AF - 90 - 10	1.16x10 ^{8a}	2.50x10 ^{7a}	0.81±0.02	72.21
AF - 110 - 5	0.90x10 ^{8a}	1.65x10 ^{5b}	2.77±0.26	62.5
AF - 110 - 10	1.00x10 ^{8a}	4.00x10 ^{5b}	3.40±0.00	76.29

Los valores son la media ± error estándar, $n = 3$. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). AF = Fructanos de agave; 5 y 10 = % sólidos; 70, 90 y 110 = Temperatura de entrada al secador.

La viabilidad (8 Log UFC/g microcápsulas) observada en los encapsulados de *S. boulardii* es indicativa de la eficiencia de las agavinas como material pared para encapsular y proteger al microorganismo probiótico. La eficiencia en la encapsulación se puede asociar a que las agavinas son altamente solubles y poseen baja viscosidad, lo que conlleva a tener dispersiones más homogéneas del material pared respecto al material que se desea encapsular. Se ha reportado anteriormente que estas características permiten obtener mayor viabilidad del probiótico (Chandralekha *et al.*, 2016).

Se observó un efecto significativo de la temperatura de entrada de aire en la viabilidad de *S. boulardii*, de esta manera, al encapsular por arriba de 110 °C reduce significativamente la viabilidad de *S. boulardii*, disminuyendo el efecto protector de las agavinas contra las condiciones de encapsulación. Se ha reportado que después de atomizar la solución en la cámara de secado durante la formación de las partículas, al aumentar la temperatura de entrada del aire, consecuentemente incrementa la temperatura de salida del aire en la cámara de secado, exponiendo las partículas a una alta temperatura que afecta

la viabilidad del probiótico (Arslan *et al.*, 2015). Sin embargo, con el uso de agavinas se observaron rendimientos de 62 a 77%, porcentaje mayor a los obtenidos con otros material pared como, maltodextrina ($40.39 \pm 6.37\%$), gelatina ($39.94 \pm 5.82\%$), goma arábica ($46.63 \pm 2.50\%$) y proteína de suero de leche concentrada ($54.65 \pm 1.04\%$) en la encapsulación de *S. boulardii* (Arslan *et al.*, 2015), por lo que los fructanos de agave o agavinas son un material pared que compite muy bien con otros materiales en cuanto a protección y rendimiento de obtención de microcápsulas de *S. boulardii* se refiere.

Considerando los datos obtenidos de rendimiento de la encapsulación y la viabilidad de *S. boulardii*, en las microcápsulas, los mejores tratamientos fueron AF-70-10 y AF-90-10, con un rendimiento o eficiencia de encapsulación del 77% y 72% y alcanzando una viabilidad de 1.7×10^7 y 2.50×10^7 UFC/g, respectivamente. Aun así, en todos los tratamientos, con excepción de los realizados a 110°C, se obtuvo un rendimiento mayor al que se ha reportado al utilizar maltodextrina, almidón de maíz, leche en polvo, gelatina, goma acacia y beta ciclodextrina como material pared para encapsular *S. boulardii* (Chandralekha *et al.*, 2016; Arslan *et al.*, 2015).

Caracterización morfológica de las microcápsulas de secado por aspersion

La morfología y microestructura de los encapsulados es importante para conocer el comportamiento del material pared con el compuesto o microorganismo encapsulado, tamaño de partícula y características estructurales de los encapsulados que ayudan a conocer más acerca de los encapsulados y cómo pueden utilizarse y almacenarse adecuadamente (Ortiz-Basurto *et al.*, 2017; Ávila Reyes *et al.*, 2014). En el Cuadro 4 se muestra el tamaño de partícula obtenido para cada tratamiento. Se observó que estos no son uniformes y varían desde los 0.39 a los 9.10 μm . Sin embargo, se obtuvieron cápsulas de un tamaño de partícula menor a los que han sido reportados utilizando otros materiales de pared como maltodextrina, almidón de maíz, sacarosa y sorbitol, donde se han obtenido tamaños de partícula desde

2 a 9 μm . Se ha reportado que un tamaño de partícula pequeño conduce a una aglomeración espontánea y a una mayor dispersabilidad (Chandralekha *et al.*, 2016; Suryabhan *et al.*, 2019).

Cuadro 4. Tamaño de partícula de los encapsulados de *Saccharomyces boulardii*

Tratamiento	Menor (μm)	Mayor (μm)	Promedio (μm)
FA-70-5	0.3715	7.43	2.4419
FA-70-10	0.4911	8.276	1.7406
FA-90-5	0.8909	4.758	2.6697
FA-90-10	0.3157	6.519	1.7430
FA-110-5	0.9342	9.102	3.9599
FA-110-10	0.4857	5.675	2.3696

AF = Fructanos de agave; 5 y 10 = % sólidos; 70, 90 y 110 = Temperatura de entrada al secador

Las micrografías de los encapsulados obtenidos se presentan en la Figura 1. Se observó que los encapsulados tienen una forma esférica y con una superficie irregular. La esfericidad indicó que el uso de agavinas no influyó en la morfología de los encapsulados. Así mismo, no se observaron fracturas o grietas en la superficie de los encapsulados, los cuales indican que la pared no es tan frágil y asegura la viabilidad de *S. boulardii* (Chandralekha *et al.*, 2016). Respecto a la superficie irregular de las capsulas, se ha reportado anteriormente que esta se debe principalmente a las características del material pared y a la temperatura de entrada. Altas temperaturas permiten que se formen rápidamente una costra, por lo cual la difusión del agua se limita solo a la superficie creando un potencial de presión que provoca la formación de las concavidades (Arslan-Tontul & Erbas, 2017).

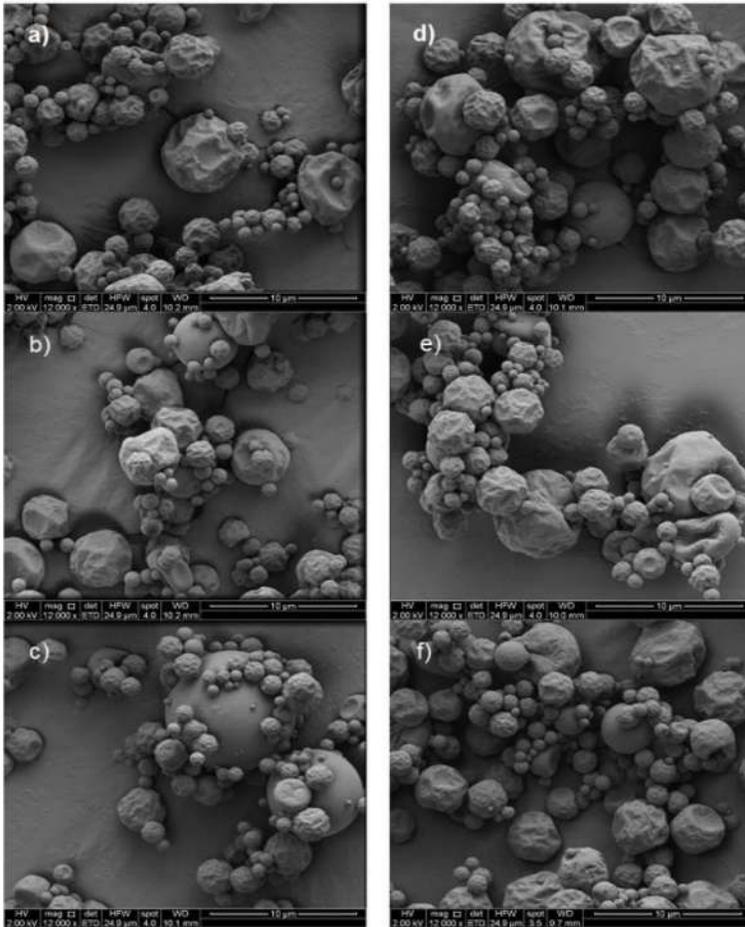


Figura 1. Micrografías de los encapsulados de *Saccharomyces boulardii* obtenidos por SEM. A) FA-70-5, B) FA-90-5, C) FA-110-5, D) FA-70-10, E) FA-90-10, F) FA-110-10. Elaboración propia.

Conclusiones

El uso de Fructanos de *Agave angustifolia* Haw. como material pared en la encapsulación de *Saccharomyces boulardii* ha mostrado características particulares en comparación con otros materiales, entre estas una baja

reducción en la viabilidad de *S. boulardii* y un alto rendimiento de obtención de microcápsulas al término de secado, con un porcentaje de sólidos del 10% y utilizando temperaturas por debajo de los 100 °C. La concentración de agavinas demostró tener un papel importante en las propiedades fisicoquímicas y de tamaño de partícula, donde a mayor concentración se obtuvo una recuperación o rendimiento arriba del 72%. La a_w , humedad y distribución de tamaño de partícula son características que permiten mantener a las microcápsulas en condiciones adecuadas de almacenamiento y para ser adicionadas en distintas matrices alimentarias.

Referencias

- Arslan-Tontul, S., & Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *LWT - Food Science and Technology*, *81*, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.060>
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>
- Ávila-Reyes, S. V., Camacho-Díaz, B. H., Acosta-García, M. C., Jiménez-Aparicio, A. R., & Hernández-Sánchez, H. (2016). Effect of salt and sugar osmotic stress on the viability and morphology of *Saccharomyces boulardii*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, *1*(3), 593–602. <https://doi.org/10.22161/ijeb/1.3.43>
- Ávila-Reyes, S. V., García-Suárez, F. J., Jiménez, M. T., San Martín-González, M. F., & Bello-Pérez, L. A. (2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*, *102*(1), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.033>
- Ceja-Medina, I. L., Ortiz-Basurto, I. R., Medina-Torres, L., Calderas, F., Bernad-Bernad, J. M., González-Laredo, F. R., Ragazzo-Sánchez, A. J., Calderón-Santoyo, M., González-Ávila, M., Andra-

- de-González, I., & Manero, O. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* by spray drying with mixtures of Aloe vera mucilage and agave fructans as wall materials. *Journal Food Process Engineering*, 43(8), <https://doi.org/10.1111/jfpe.13436>
- Chandralekha, A., Tavanandi, A. H., Amrutha, N., Hebbar, H. U., Raghavarao, K. S. M. S., & Gadre, R. (2016). Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life. *Drying Technology*, 34(11), 1307–1318. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1112808>
- Chávez-Falcón, M. S., Buitrago-Arias, C., Ávila-Reyes, S. V., Solorza-Feria, J., Arenas-Ocampo, M. L., Camacho-Díaz, B. H., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2022). Kinetics and Mechanisms of *Saccharomyces boulardii* Release from Optimized Whey Protein–Agavin–Alginate Beads under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Bioengineering*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090460>
- Duongthingoc, D., George, P., Katopo, L., Gorczyca, E., & Kasapis, S. (2013). Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. *Food Chemistry*, 141(3), 1782–1788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.093>
- Espinosa-Andrews, H., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2018). Water state diagram and thermal properties of fructans powders. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 132(1), 197–204. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6868-1>
- Espinosa-Andrews, H. & Urias-Silvas, J. E. (2012). Thermal properties of agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2671–2676. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.053>
- Espinosa-Andrews, H., Urias-Silvas, J. E., & Morales-Hernández, N. (2021). The role of agave fructans in health and food applications: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 114(June), 585–598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.022>
- Fabela-Morón, M. F., Porras-Saavedra, J., Martínez-Velarde, R., Jiménez-Aparicio, A., Arenas-Ocampo, M. L., & Alamilla-Beltrán, L. (2015). Physical-chemical properties and microstructure of agave

- powders obtained by spray drying. En G. Gutiérrez-López, L. Alamillo, M. Buera, J. Welti, E. Parada & G. Barbosa (eds.) *Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems* (pp. 345–351). Springer Boston. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2578-0>
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03873>
- Farías Cervantes, V. S., Delgado Lincon, E., Solís Soto, A., Medrano Roldan, H., & Andrade González, I. (2016). Effect of spray drying temperature and agave fructans concentration as carrier agent on the quality properties of blackberry powder. *International Journal of Food Engineering*, 12(5), 451–459. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2015-0287>
- Lazo-Vélez, M. A., Serna-Saldívar, S. O., Rosales-Medina, M. F., Tinoco-Alvear, M., & Briones-García, M. (2018). Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 943–951. <https://doi.org/10.1111/jam.14037>
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7835–7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- Ortiz-Basurto, R. I., Rubio-Ibarra, M. E., Ragazzo-Sánchez, J. A., Beristain, C. I., & Jiménez-Fernández, M. (2017). Microencapsulation of *Eugenia uniflora* L. juice by spray drying using fructans with different degrees of polymerisation. *Carbohydrate Polymers*, 175, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.030>
- Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., & Teixeira, M. C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? *Journal of Fungi*, 6(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Food Microencapsulation: A Review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Rajam, R., & Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics:

- past, present and future. *University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11, 46. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00228-w>
- Sandoval-Peraza, V. M., Cu-Cañetas, T., Peraza-Mercado, G., & Ace-reto-Escoffié, P. O. M. (2016). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. En M. Ramírez (ed.) *Propiedades funcionales de hoy* (pp. 181–218). <https://doi.org/10.3926/oms358>
- Suryabhan, P., Lohith, K., & Anu-Appaiah, K. A. (2019). Sucrose and sorbitol supplementation on maltodextrin encapsulation enhance the potential probiotic yeast survival by spray drying. *LWT*, 107, 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.002>
- Thomas, M. ben, Vaidyanathan, M., Radhakrishnan, K., & Raichur, A. M. (2014). Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces bou-lardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan-dextran sulfate polyelectrolytes. *Journal of Food Engineer-ing*, 136, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.015>
- Zamora-Vega, R., Montáñez-Soto, J. L., Martínez-Flores, H. E., Flo-res-Magallón, R., Muñoz-Ruiz, C. V., Venegas-González, J., & Ariza Ortega, T. D. J. (2012). Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the microencapsulation of *Saccharomyces bou-lardii*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(8), 930–935. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.687364>

3.5 OBTENCIÓN DE SAPONINAS DE *Agave angustifolia* Haw POR EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

Adriana Madrazo Rojas¹, Rafael Bahena Pérez¹, Enrique Jiménez Ferrer², Argelia López Bonilla¹, Brenda Hildeliza Camacho Díaz^{1*} y Martha Lucía Arenas Ocampo^{1*}

RESUMEN

Los agaves han sido utilizados para la elaboración de bebidas alcohólicas y fibras, también han tenido relevancia en la medicina tradicional, siendo esta la base para identificar y evaluar los efectos farmacológicos de sus metabolitos secundarios, entre ellos se encuentran las saponinas. Se ha identificado su actividad antifúngica, antiinflamatoria y anticancerígena. Esto ha llevado a buscar un método de extracción que sea eficiente y mejore los rendimientos, además de disminuir los tiempos de extracción. Entre los métodos que se han utilizado en la actualidad se encuentra la extracción asistida por microondas (MAE), el cual ha demostrado ser un método eficiente y rápido. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de saponinas en un extracto de *Agave angustifolia* obtenido por extracción asistida por microondas, utilizando solventes de mediana y alta polaridad (etanol, acetona y metanol), así como la variación de los parámetros tiempo, potencia y temperatura. De los resultados obtenidos se observó que el extracto acetónico con un tiempo de extracción de 7 y 10 minutos y una potencia de 100 W fueron los que presentaron mayor concentración de saponinas con respecto a la extracción por maceración. Por

¹ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, P.O. Box 24, Yauhtepec 62730, Morelos, México.

*bcamacho@ipn.mx; mlarenas@ipn.mx

² Centro de Investigación Biomédica del Sur (IMSS), Argentina No. 1, Col Centro, Xochitepec C.P. 62790, Morelos, México.

lo cual se puede concluir que el método de extracción tiene ventajas como la disminución del tiempo de extracción, ahorro de energía y disminución en la cantidad de disolvente.

PALABRAS CLAVE: MAE, saponinas, agave, extracto acetónico.

Introducción

Las plantas del género *Agave* tienen importancia económica y cultural en México, entre sus usos principales se encuentra la elaboración de bebidas alcohólicas, la obtención de fibras y actualmente se ha dado enfoque a la reutilización de los residuos agrícolas generados por la industria tequilera y textil para disminuir la contaminación ambiental. Otro de sus usos es en la medicina tradicional, la cual ha sido una guía para la investigación de la actividad farmacológica de las diversas especies de agave. Dentro de los metabolitos encontrados en agave están los flavonoides, quercetina, ácidos fenólicos, saponinas esteroidales, cantalasaponina-1, β -sitosterol y glucósido de β -sitosterol, los cuales han demostrado efecto antiinflamatorio, antiulcerogénico, antifúngico, antineoplásico, inmunomodulador y antidiabético (El-Hawary *et al.*, 2020; 2019; Santos-Zea *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2017; Hernández-Valle, 2014). Las saponinas son metabolitos con propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas. Se han identificado 28 saponinas esteroidales, 86 saponinas glicosiladas en agave y la identificación sigue en aumento. Se han demostrado sus actividades antifúngicas, antiinflamatorias, citotóxicas, anticancerígenas y hemolíticas (Sidana *et al.*, 2016).

A partir de diferentes partes de la planta se han obtenido estos metabolitos secundarios por distintos métodos de extracción, los cuales han llevado a buscar un proceso de extracción que sea eficiente y amigable con el ambiente. Entre los diferentes métodos de extracción se encuentra la maceración, Soxhlet, ultrasonificación, fluido supercrítico y microondas. La extracción asistida por microondas (Microwave-assisted extraction) es un método eficiente y se ha demostrado que el rendimiento puede ser mayor si se trabaja con

las condiciones específicas para cada metabolito. Es una técnica que ofrece ventajas ambientales, como el uso de menor cantidad de disolvente, menor consumo de energía y usos de disolventes no tóxicos, lo cual permite una extracción más rápida y selectiva (Zhang *et al.*, 2011). La extracción por microondas se basa en un calentamiento selectivo generado por la fricción molecular debida a la alineación de iones y dipolos al campo eléctrico oscilante de las microondas. Al penetrar las microondas en los biomateriales generan calor debido a que interactúan con moléculas polares como el agua dentro de los materiales vegetales. La profundidad de penetración en la matriz vegetal depende de la constante dieléctrica, el contenido de humedad, la temperatura y la frecuencia del campo eléctrico. La absorción de energía de las microondas está relacionada con el agua contenida en el material vegetal, lo que conduce al sobrecalentamiento interno y la alteración de la estructura celular facilitando la difusión del compuesto bioactivo desde la matriz vegetal. La eficacia de este método se basa en el efecto de las microondas sobre el disolvente y la estructura celular de la matriz vegetal (Takeuchi *et al.*, 2009).

El uso de la extracción asistida por microondas para la obtención de saponinas se ha realizado en especies como *Ganoderma atrum*, *Panax notoginseng*, *Bupleurum chinense*, *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. kernel, *Dioscorea zingiberensis*, *Gymnema sylvestre*, *Pulsatilla turczaninovi* y *Lamii albi flos*. En términos de rendimiento, se ha demostrado que MAE es superior en la extracción de saponinas en comparación con otros métodos de extracción y también se ha comprobado que el tiempo de extracción es más corto (Xu *et al.*, 2012).

Debido a que el agave contiene saponinas como uno de sus metabolitos mayoritarios y que estos tienen efectos farmacológicos, se ha propuesto evaluar la extracción asistida por microondas para la obtención de saponinas con disolventes de mediana y alta polaridad; utilizando pencas de agave para analizar el rendimiento tomando en cuenta los parámetros como potencia, tipo de disolvente y tiempo de extracción.

Materiales y métodos

En la extracción asistida por microondas es importante el manejo de parámetros como la temperatura, la potencia en Watts, el tipo de disolvente y el tiempo de irradiación, ya que de ellos depende el rendimiento del extracto y se evita la pérdida del metabolito debido a las altas temperaturas.

Para realizar la extracción asistida por microondas y elegir el disolvente más adecuado para la obtención de saponinas, así como el tiempo de irradiación, temperatura y potencia, se manejaron diferentes tiempos de extracción con los disolventes de mediana y alta polaridad. El material vegetal fue obtenido de un cultivo controlado de *Agave angustifolia* Haw en el municipio de Tlaquiltenango, Morelos, México (8°37'48''N, 99°10'00'' a 1120 m.s.n.m.). Se utilizaron pencas de plantas de 5 años, se lavaron, pesaron y trituraron, después se llevaron al cuarto de secado donde se mantuvieron a 40°C durante 3 días y se procedió al molido y tamizado. Se utilizaron 60 mL de los diferentes disolventes y 6g de material vegetal en una proporción 1:10 material vegetal: disolvente. Se realizaron diversas pruebas con la técnica de extracción asistida por microondas (MAE), en sistema abierto con disolventes de mediana y alta polaridad (acetona, metanol y etanol), variando los parámetros de potencia y tiempo. En la Tabla 1 se muestran los parámetros utilizados para la realización de las pruebas de extracción asistida por microondas, se detalla el nombre y número de muestras, así como el tiempo y la potencia utilizadas para obtener los extractos acetónicos, metanólicos y etanólicos.

Tabla 1. Parámetros para las pruebas de extracción asistida por microondas para etanol, acetona y metanol

Disolventes								
Etanol			Acetona			Metanol		
N	Tiempo	W	N	Tiempo	W	N	Tiempo	W
Et1	5 min	100	Ac1	10 min	100	Met1	10 min	100
Et2	3 min	100	Ac2	10 min	150	Met2	10 min	150
Et3	2 min	100	Ac3	10 min	200			
Et4	5 min	150	Ac4	5 min	100			

Et5	3 min	150	Ac5	5 min	150
Et6	2 min	150	Ac6	5 min	200
Et7	5 min	200			
Et8	3 min	200			
Et9	10 min	150			
Et10	10 min	100			

W= Potencia en Watts N= Nombre de la muestra del extracto de *Agave angustifolia*

Para llevar a cabo la extracción asistida por microondas se utilizó el equipo de microondas CEM Discover® (equipo de 300 W a 2450 MHz de potencia máxima), Matthews, NC, EE. UU. Después de obtener los extractos de cada uno de los disolventes, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) para observar los componentes presentes y determinar el extracto con mayor presencia de saponinas con respecto al estándar.

Para la comparación de los extractos en la cromatografía en capa fina se utilizaron placas en fase reversa, un estándar de saponinas triterpénicas *Quillaia saponins* (Y0001537) y otro de ácido ursólico, en fases móviles de acetonitrilo y agua 7:3 y 8:2. Después las placas se revelaron con vainillina al 1% (Jork *et al.*,1990) mediante calentamiento durante 3 minutos a 100 °C. Posteriormente se realizó una placa en HPTLC fase reversa y usando acetonitrilo agua 7:3 como fase móvil y el revelador de vainillina al 1% para determinar cuáles muestras contenían saponinas en mayor concentración. Se utilizó una muestra del extracto obtenido por un método convencional como maceración utilizando la misma cantidad de material vegetal (6 g) y el mismo volumen de disolvente, realizando una extracción durante 48 horas y de esta manera comparar los tiempos de extracción y la cuantificación de saponinas por ambos métodos.

Resultados y discusión

La extracción asistida por microondas ha sido utilizada para la cuantificación de saponinas en diferentes plantas, entre ellas se encuentra

Panax notoginseng. Kwon *et al.* (2003) indicaron que MAE fue superior al método convencional en su capacidad para extraer saponinas sin causar degradación. A partir de un extracto etanólico al 50% de *Bupleurum chinens*. Hu *et al.* (2008) refieren que las condiciones óptimas para MAE fueron 5.8-6 minutos y 360 a 400W para la obtención de saikosaponinas a y d. Los resultados arrojados por la CCF de fase reversa con sistema 7:3 y 8:2 se observan en la Figura 1.

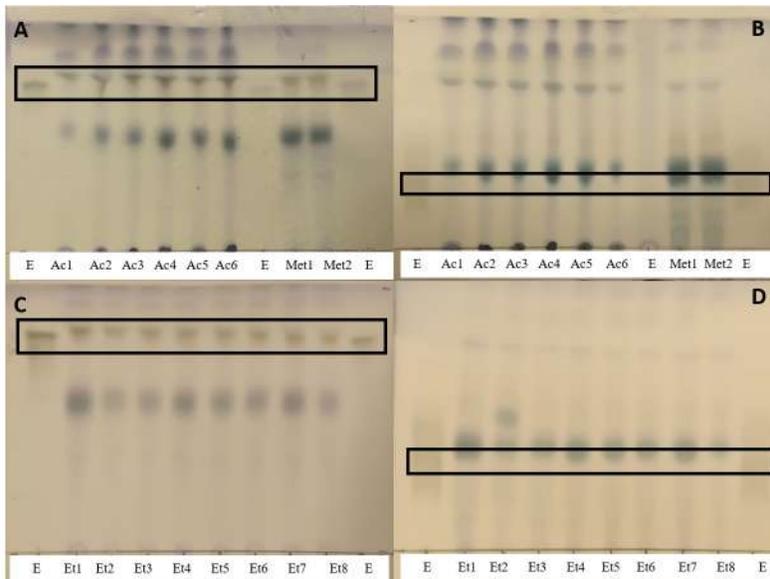


Figura 1. Cromatoplaqa de extractos acetónicos, metanólicos y etanólicos. (En la figura 1A se observan los extractos acetónicos (1 → 6) y metanólicos (1 → 2) con estándar de saponinas en sistema de elución 7:3 acetonitrilo:agua. En la figura 1B se observan los extractos acetónicos (1 → 6) y metanólicos (1 → 2) con estándar de saponinas a los extremos de la placa y estándar de saponinas dividiendo los extractos acetónicos y metanólicos en sistema de elución 8:2 acetonitrilo:agua. En la figura 1C es posible observar los extractos etanólicos (1 → 8) con estándar de saponinas en ambos extremos de la CCF en un sistema de elución. La figura 1D muestra los extractos etanólicos (1 → 8) con estándar de saponinas en ambos extremos de la CCF en un sistema de elución 8:2 acetonitrilo:agua.).

En las placas se observa que en los extractos acetónicos (1A) pueden encontrarse algunos compuestos mayoritarios y una coincidencia con el estándar de saponinas utilizado. Por su parte, en los extractos metanólicos, al igual que el extracto acetónico, una banda parece coincidir con el estándar de saponinas utilizado. Cuando se cambia la concentración del sistema de elución, las bandas son más tenues. Por último, en los extractos etanólicos eluidos con acetonitrilo-agua 8:3 (1C) se pueden observar bandas más tenues. Es posible distinguir algunas bandas a la altura del estándar de saponinas utilizado como referencia, lo que podría indicar la presencia de estas en dicho extracto.

Posteriormente, se evaluaron los extractos en HPTLC para observar con las muestras que presentaba. Según lo observado en las pruebas con CCF, se seleccionaron los extractos con mayor presencia de compuestos mayoritarios y los que presentaron bandas más nítidas. Para esta evaluación fueron los seis extractos acetónicos, los extractos metanólicos y los dos extractos etanólicos más representativos. Se observó la presencia de cuatro bandas perfectamente definidas en los extractos acetónicos. En el caso de los extractos metanólicos y etanólicos solo es posible observar la presencia de tres bandas, todas ellas menos definidas en comparación con los extractos acetónicos.

En la placa de fase normal revelada con vainillina (Figura 2) se observa la presencia de una banda bien definida en los extractos acetónicos, siendo más clara en el extracto Ac1, Ac4 y Ac6. La presencia de esta banda, aunque muy tenue, fue observada en los extractos etanólicos, excepto en el (Et9) y se observó la presencia de una banda en el punto de aplicación correspondiente al estándar utilizado.

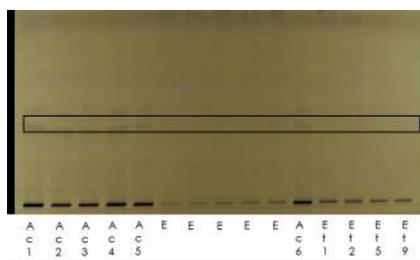


Figura 2. Cromatopla de fase normal revelada con vainillina

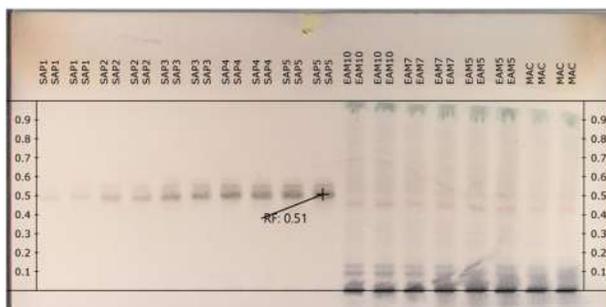


Figura 3. Identificación de saponinas en 4 diferentes extractos, por los métodos de extracción por maceración y MAE. Derivatización con vainillina 1%. Carriles de 1-10 St. Quillaia saponins, 11-12 extracción asistida por microondas 10 minutos, 13-14 extracción asistida por microondas 7 minutos, 15-16 extracción asistida por microondas 5 minutos, 17-18 extracción por maceración

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de saponinas en las extracciones obtenidas por microondas y por maceración. Se utilizó estándar en diferentes concentraciones, observando que el estándar de SAP 2 es el que coincide con la cantidad de saponinas con respecto a la extracción asistida por microondas de 10 minutos y de 7 minutos, mientras que para el método de maceración de 48 horas la concentración es muy baja con respecto al estándar de menor concentración (SAP1).

Tabla 2. Cuantificación de saponinas en muestras de extracción asistida por microondas y maceración

Muestra	Cuantificación en mg/mL
St SAP1	0.02580406
St SAP2	0.0269533
St SAP3	0.02927376
St SAP4	0.03154398
St SAP5	0.03244202
EAM 10	0.02665186
EAM 7	0.0261997
EAM 5	0.0257444
MAC	0.02492172

Con base en los resultados anteriores, se eligió el extracto EAM10 y EAM7, cuyos parámetros de tiempo y potencia fueron de 10 y 7 minutos y 100 Watts respectivamente y una temperatura de 45°C. A partir de 1,440 g de peso seco se obtuvo un total de 24.9 g de extracto, es decir, se tuvo el 1.72% de rendimiento de extracción.

Conclusiones

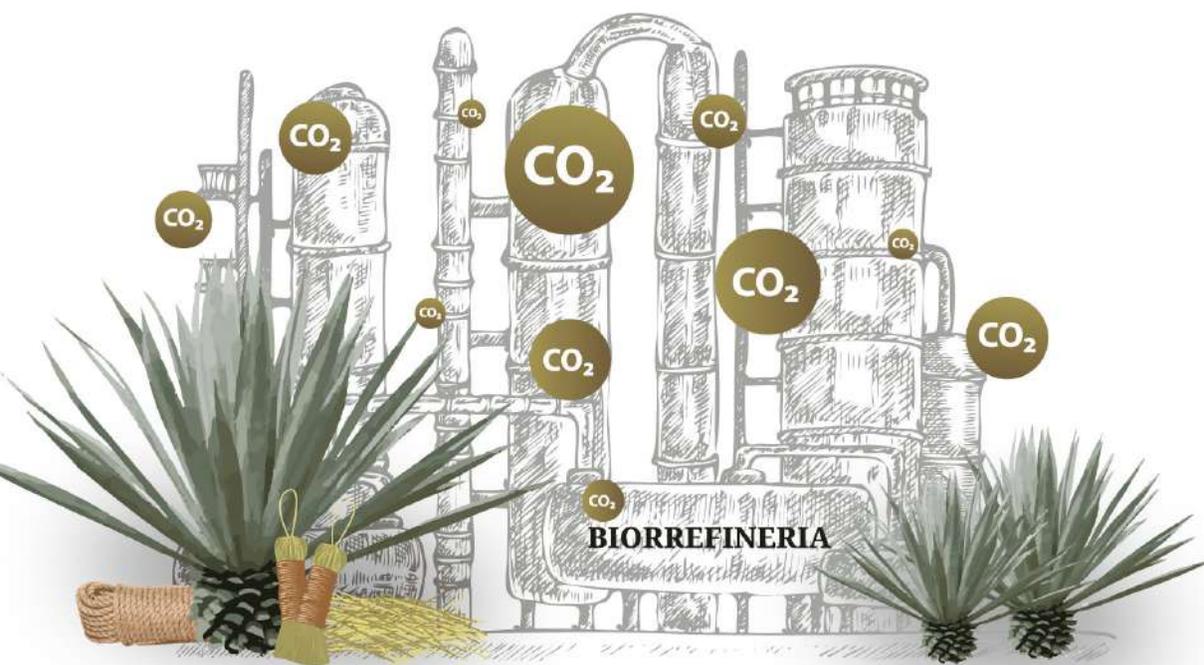
Se obtuvo un extracto por extracción asistida por microondas y se observaron saponinas en los extractos de Agave. *Angustifolia* de 7 y 10 minutos, lo cual permitió comprobar que dicha extracción es un método eficiente, y con tiempo de extracción corto con respecto al método convencional y por lo tanto genera ahorro de energía. Estos resultados podrían sugerir una optimización del método para la obtención de saponinas en agave.

Referencias

- El-Hawary, S. S., El-Kammar, H. A., Farag, M. A., Saleh, D. O., & El Dine, R. S. (2020) Metabolomic Profiling of Five Agave Leaf Taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS In relation to Their Anti-Inflammatory, Immunomodulatory and Ulceroprotective Activities. *Steroids*, 160, 108648. doi: 10.1016/j.steroids.2020.108648.
- Hernández-Valle, E., Herrera-Ruiz, M., Salgado, G., Zamilpa, A., Ocampo, M., Aparicio, A., Tortoriello, J., & Jiménez-Ferrer, E. (2014). Anti-Inflammatory Effect of 3-O-[(6'-O-Palmitoyl)-β-D-glucopyranosyl Sitosterol] from *Agave angustifolia* on Ear Edema in Mice. *Molecules*, 19(10), 15624–15637. <https://doi.org/10.3390/molecules191015624>
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., & Wimmer, H. (1990). *Thin Layer Chromatography, Vol. 1a and b, Physical and Chemical Detection Methods*. ISBN 3-527-27834-6 (VCH, Weinheira)
- Pereira, G. M., Ribeiro, M. G., da Silva, B. P., & Parente, J. P. (2017). Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. *Marginata* and a preliminary investigation of its in

- vivo antiulcerogenic activity and in vitro membrane permeability property. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(18), 4345–4349. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.026>
- Santos-Zea, L., Fajardo-Ramírez, O. R., Romo-López, I., & Gutiérrez-Uribe, J. A. (2016) Fast Centrifugal Partition Chromatography Fractionation of Concentrated Agave (*Agave Salmiana*) Sap to Obtain Saponins with Apoptotic Effect on Colon Cancer Cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 57–63 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0525-2>.
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016) Saponins of Agave: Chemistry and Bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22–46. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.06.010.
- Takeuchi, T. M., Pereira, C. G., Braga, M. E. M., Maróstica, M. R., Leal, P. F., & Meireles, M. A. A. (2009). Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. En M. A. A. Meireles (ed.), *Extracting bioactive compounds for food products—Theory and applications* (pp. 140–144). CRC Press
- Zhang, H. F., Yang, X. H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (12), 672–688. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.07.003>

4.-Aprovechamiento integral y sostenible de los agaves y sus subproductos



4.1 MATERIALES COMPUESTOS DE MATRIZ POLIMÉRICA CON REFUERZO CELULÓSICO: UNA ALTERNATIVA DE ALTO VALOR AGREGADO PARA LOS AGAVES

Pedro Jesús Herrera Franco^{1*} y Alex Valadez Gonzalez¹

RESUMEN

El uso de fibras naturales de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) como agente de refuerzo para la elaboración de materiales compuestos se presentó como una alternativa de uso. Su uso en matrices de tipo polimérico para hacer materiales compuestos “verdes” resultó en propiedades de resistencia superiores utilizando un agente acoplante adecuado. El incremento de las propiedades de tensión fue de 25% aproximadamente. Su uso como refuerzo de una matriz cementicia resultó en un incremento de la resistencia a la compresión del 40%. Estos materiales fueron utilizados como una alternativa en la elaboración de elementos constructivos, con métodos simples para usarse en la construcción de vivienda.

PALABRAS CLAVE: Fibra natural; interfase fibra-matriz; matriz polimérica; matriz cementicia; hormigón espumado

¹ Unidad de Materiales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México
*pherrera@cicy.mx

Introducción

En los últimos 40 años, los materiales compuestos han tenido una amplia aceptación en variedad de áreas, especialmente en la industria aeronáutica y aeroespacial. En fechas recientes, su uso se ha extendido a diversas aplicaciones de uso en el hogar, la industria del transporte, de la construcción, en los deportes, etc. Un material compuesto consiste de una fase discontinua, por lo general más fuerte y rígida que la fase continua en la que se encuentran embebida. La fase discontinua es denominada “inclusión” o “refuerzo”, mientras que la fase continua es denominada la “matriz” y también transfiere la carga de las fibras rotas a las fibras intactas a través de la interfaz fibra/matriz. Los polímeros sintéticos, termoplásticos, termofijos y elastómeros son comúnmente usados como matrices en la elaboración de materiales compuestos. También se han desarrollado matrices de tipo cementicio o cerámico.

Preocupaciones ambientales sobre las grandes cantidades de desechos generados a partir de polímeros y compuestos a base de petróleo que terminan en vertederos han estimulado una mayor investigación en el desarrollo de nuevos materiales más ecológicos (Netravali *et al.*, 2003). Los materiales compuestos “verdes” derivados de recursos renovables, principalmente de plantas, tienen un gran potencial para brindar beneficios ambientales y económicos a las industrias y usuarios finales frente a la disminución de los recursos petroleros.

Las fibras naturales les imparten a los materiales compuestos termoplásticos beneficios tales como: menor densidad, biodegradabilidad, menor desgaste del equipo durante su procesamiento, la posibilidad de ser reciclados, buena relación de propiedades mecánicas por unidad de peso, bajo costo por unidad de volumen, buenas propiedades de aislamiento y de amortiguación acústica. Desde el punto de vista social y económico, el uso de fibras naturales resulta en beneficios tales como: generación de fuentes de empleo en zonas rurales, uso de materiales que provienen de fuentes renovables, bajo consumo de energía de producción y, por lo tanto, son amigables al medio ambiente. Entre sus desventajas se pueden mencionar: absor-

ción de humedad y temperatura de degradación relativamente baja (importante para la selección de la matriz y condiciones de procesamiento del material compuesto).

Por su naturaleza hidrofílica, las fibras naturales tienen una adherencia pobre con las matrices poliméricas que tienen una naturaleza hidrofóbica. Esto resulta en un material con propiedades de resistencia mecánica inferiores. Diversos enfoques han sido propuestos en la literatura técnica para resolver este problema. Uno de ellos es la modificación de las propiedades superficiales de la fibra para promover su adherencia a algún polímero específico (Abdelmouleh *et al.*, 2007, Valadez-Gonzalez, 1999).

La interfase fibra-matriz y su importancia

En un material compuesto polimérico la región que se genera entre la matriz polimérica y el refuerzo es conocida como “interfase”. Las propiedades de la región interfacial son diferentes a las de la matriz y del refuerzo y estas son el resultado de las interacciones entre ambos. Estas interacciones brindan al material compuesto el nivel de adherencia y su naturaleza puede ser mecánica, física y química. La interacción mecánica es debida a la fricción de tipo Coulomb entre fibra y matriz; la interacción física es debida al enredado de cadenas poliméricas y también las interacciones físicas dipolo-dipolo, dipolo inducido y dispersión Van der Waals. Las interacciones químicas se atribuyen a enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes. Existen otros factores que afectan a las propiedades de la región interfacial, entre ellos podemos mencionar la morfología de la matriz y de la fibra, especies químicas sin reaccionar (especialmente en el caso de resinas termofijas), impurezas, burbujas de aire y la topografía de la fibra.

Se considera que la región interfacial es de suma importancia en el material compuesto porque es en ella donde se realiza la transferencia de fuerzas entre la matriz y la fibra. Por lo tanto, una buena adhesión en la región interfacial da como resultado una resistencia interfacial alta y, por consiguiente, una eficiente transferencia de fuerzas. La Figura 1 muestra de manera esquemática el concepto de “interfase”.

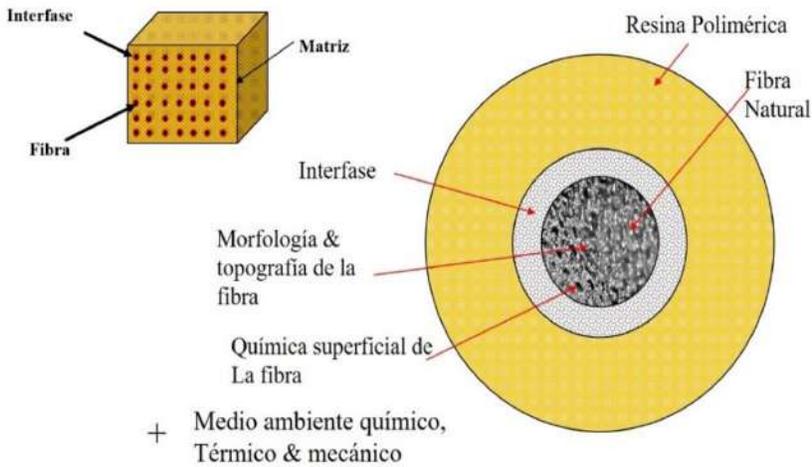


Figura 1. El Concepto de interfase fibra-matriz

Materiales compuestos a base de mortero y concreto fibrorreforzado con fibras naturales

La tecnología del concreto y mortero fibrorreforzado consiste en adicionar fibras vegetales al concreto o mortero, con la finalidad de mejorar el comportamiento mecánico, sobre todo a flexión. El uso de fibras vegetales es atractivo ya que su costo es menor que el de las fibras sintéticas comerciales utilizadas como refuerzo del concreto o mortero. Las fibras vegetales poseen un módulo de elasticidad más bajo que el de fibras utilizadas en el concreto. Sin embargo, el concreto o mortero fibrorreforzado con fibras vegetales ofrece ventajas como: mayor ductilidad, mayor resistencia a la tensión y una marcada resistencia residual después de la falla. Una desventaja en el uso de las fibras naturales es el período de estabilidad de la fibra vegetal en una matriz del cemento. Los poros de agua de un cemento ordinario están saturados con iones alcalinos, con un pH cercano a 12.4.

La selección de las fibras naturales para ser utilizadas en compuestos de cemento se debe realizar en función de los componentes orgánicos solubles que retardan la hidratación del cemento. Es sabido que el contenido de lignina beneficia interacción de la fibra con la ma-

triz de cemento, mientras que tanto la celulosa como la hemicelulosa, debido a su solubilidad en un ambiente alcalino, debilitan fuertemente esta interacción. Bajo estas consideraciones las fibras vegetales pueden ser utilizadas para la construcción de ciertas estructuras como: tanques de almacenamiento, tuberías, pisos y cubiertas.

El objetivo principal de este estudio fue el uso de fibras de henequén (*Agave fourcroydes*) para ser incorporada en matrices poliméricas y una matriz cementicia para la elaboración de elementos constructivos. Además, proponer estos elementos constructivos combinados con métodos simples, materiales e insumos regionales de Yucatán para usarse en la construcción de vivienda de bajo costo.

Materiales y métodos

Producción de materiales compuestos de matriz polimérica y refuerzo de fibra natural

En la Figura 2 se muestra de manera esquemática el programa experimental para la modificación superficial de la fibra natural. Se utilizó polietileno de alta densidad (Quantum Chemical Company) con una densidad de 0.95 g/cm^3 , un índice de fluidez de 0.3 g/10 min (determinado usando el estándar ASTM D-1238-79 a $190 \text{ }^\circ\text{C}$ y 2.16 Kg) y un punto de fusión de $135 \text{ }^\circ\text{C}$. La fibra de henequén fue obtenida de DESFIYUSA (Desfibrador Yucateca, S.A.) de Mérida, Yucatán. Para los tratamientos superficiales a la fibra de henequén se utilizó hidróxido de sodio grado reactivo (Técnica Química) y un agente de acoplamiento, el Vinil-tris-(2-metoxi-etoxi) silano, silano A-172, (Unión Carbide) y como catalizador de la reacción entre el agente de acoplamiento y el polietileno, peróxido de dicumilo (Polyscience).



Figura 2. Esquema propuesto para modificación, caracterización de las fibras de henequén, fabricación del material compuesto y procedimientos de caracterización físico-química y mecánica del material compuesto

Preparación de matriz cementicia fibrorreforzada y determinación de resistencia a la compresión

Se preparó mortero de cemento fibrorreforzado utilizando fibras de de henequén (*Agave fourcroydes*, Lem). Se utilizó cemento tipo Portland, arena obtenida del molido de piedra caliza y agua en la cantidad necesaria para obtener una resistencia a la compresión de 175 kg/cm². Se probó la resistencia a compresión del mortero reforzado con fibras de henequén utilizando especímenes cilíndricos de 75 mm de diámetro y 150 mm de altura. Se emplearon fibras de 30, 40 y 50 mm de longitud. Se estudiaron tres concentraciones de fibra en el mortero: 1, 1.2 y 1.4 kg/m³.

Resultados y discusión

Material compuesto de polietileno de alta densidad y fibras de henequén

En la Figura 3 se muestra una gráfica de la resistencia a la tensión del material compuesto elaborado con fibras de henequén y PEAD en función del tratamiento superficial de las fibras. Los materiales com-

puestos elaborados con fibras sin tratamiento alguno, denominadas FIB, son el valor de referencia.

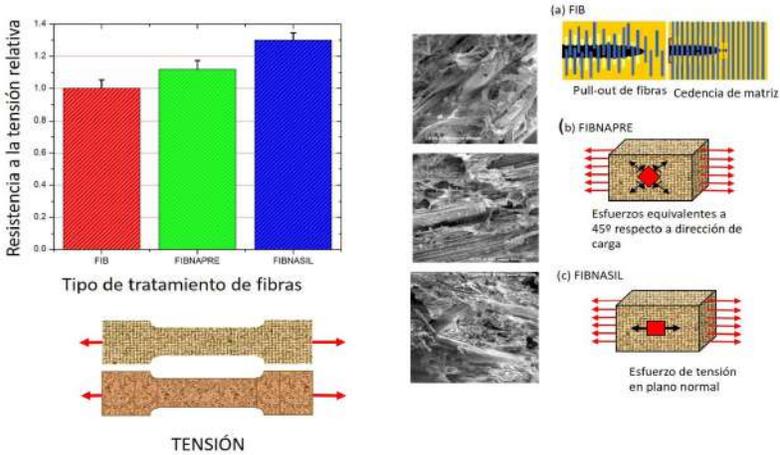


Figura 3. Resistencia a la tensión y diagrama esquemático del enfoque utilizado para modificar a la fibra de henequén, su caracterización físico-química, preparación y caracterización del material compuesto. FIB: fibra sin tratamiento, FIBNAPRE: fibra con pretratamiento con NaOH, FIBNASIL: fibra con pretratamiento con silano.

El tratamiento a base de una solución alcalina de hidróxido de sodio (FIBNAPRE) incrementa la resistencia a la tensión en aproximadamente un 10%. La incorporación de un agente de acoplamiento de tipo silano en el tratamiento superficial de las fibras (FIBNASIL) incrementa el valor de la resistencia a la tensión en aproximadamente un 25% respecto a la que no tiene tratamiento alguno. De allí la importancia de la interfase fibra-matriz y del nivel de adherencia entre ambas fases. De microfotografías (Figura 3), las superficies de falla de los especímenes cargados en tensión, obtenidas con un microscopio electrónico de barrido, se observan diferencias en las fibras. Para el caso de FIB, las fibras se ven limpias, sin residuos de resina polimérica adherida a ellas, a diferencia de FIBNAPRE Y FIBNASIL, donde se puede observar fibras con residuos de polímero adherido a ellas y de longitud menor.

Incrementos similares en el desempeño mecánico de los laminados de material compuesto, en función del tratamiento superficial a las fibras, fueron observados con otras formas de carga mecánica.

Resistencia a la compresión de mortero reforzado con fibras

Se probó la resistencia a compresión del mortero reforzado con fibras de henequén utilizando especímenes cilíndricos de 75 mm de diámetro y 150 mm de altura. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades mecánicas del mortero de cemento fibrorreforzado

Tiempo de curado (días)	Mortero sin fibra	Resistencia a la compresión del mortero (kg/cm ²)								
		1 kg/m ³			1.2 kg/m ³			1.4 kg/m ³		
		Longitud de fibra (mm)			Longitud de fibra (mm)			Longitud de fibra (mm)		
		30	40	50	30	40	50	30	40	50
7	117	195	207	170	114	148	147	141	137	140
28	177	225	247	211	174	195	205	184	181	188

Como se observa en la Tabla 1, cuando se utiliza una concentración de fibras henequén de 1.0 kg/m³ de una longitud de 40 mm se obtiene una resistencia a la compresión aproximadamente un 40% mayor que la del mortero sin fibra.

El modelo de vivienda con elementos constructivos fibrorreforzados

La vivienda que se propuso fue un modelo de autoconstrucción, de acuerdo al grado de participación de los interesados. En este proyecto la construcción fue parte de un módulo para la atención de la salud del Ayuntamiento de la ciudad de Mérida.

Los elementos constructivos

Cabe mencionar que el cemento reforzado con fibras naturales sería utilizado en paredes, pisos, muebles de baño y de cocina; el polímero reforzado con fibras naturales, en el techo. El primer material puede ser producido por los dueños de la vivienda, pues no requiere de una preparación técnica elevada y bastaría con una capacitación simple. El segundo material requiere para su fabricación de equipo más sofisticado y de personal con una capacitación mayor.

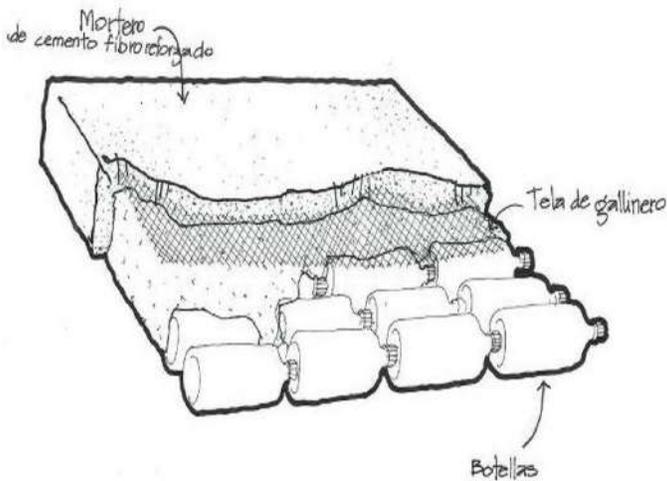


Figura 4. Corte de un elemento constructivo utilizando el mortero fibrorreforzado en forma de placa

En la Figura 5 se muestra un corte de un elemento constructivo planeado para la pared. Este sería producido en moldes de madera o metal y consta básicamente de una capa del mortero fibrorreforzado con fibra natural, una capa de malla metálica conocida como “tela de gallinero”, una capa interior de aire para incrementar su capacidad de aislamiento térmico por medio de envases desechables de PET (Poliéster Termoplástico) y una segunda capa de malla y de mortero fibrorreforzado. A continuación, se muestran fotografías del proceso fabricación de estas placas. Nótese que este proceso utiliza un molde de rectangular de madera (Figura 5).



Figura 5. Proceso de construcción de una placa. Iniciando con la imagen de arriba a hacia abajo y de izquierda a derecha: Posicionado de botellas vacías de PET sobre una capa de mortero fibrorreforzado y malla metálica, colocación de la segunda capa de malla metálica, acabado superficial final de la segunda capa de mortero fibrorreforzado y erección de placas ya terminadas.



Figura 6. Proceso de construcción de un block fibrorreforzado. Iniciando con la imagen de arriba a la izquierda en el sentido horario: llenado de los moldes, proceso de desmoldado, y pegado de bloques terminados en el muro.

Los bloques de mortero modificado se fabricaron utilizando un molde de madera, de uso y ensamblado fácil para ser llenado y también para el proceso de desmoldado. Esto permitiría la extracción fácil del bloque. Estos elementos serían erigidos en el muro de la misma manera que se erigen los bloques tradicionales y sus dimensiones serían tales que su manejo posterior sea relativamente fácil (ver Figura 6).

Techo de láminas de polímero fibrorreforzado



Figura 7. Proceso de instalación de las láminas acanaladas fabricadas a base de un polímero fibrorreforzado y relleno de carga mineral. Nótese la sujeción de las láminas utilizando birlos de acero, típicos en la instalación de láminas de zinc.

Las láminas de polímero fibrorreforzado fueron fabricadas utilizando el material compuesto descrito en la primera sección de este trabajo. Para su formación en forma acanalada se utilizó un molde y el proceso de moldeo por compresión. Se instalaron en el techo de la construcción utilizando un soporte de madera. La sujeción de dichas láminas se realizó por medio de birlos de acero, típicos en la instalación de láminas para techos a base zinc (ver Figura 7).

El hormigón espumado reforzado

El hormigón espumado, también conocido como hormigón celular o concreto liviano, es un material cementoso, con vacíos de aire en el mortero. La densidad del hormigón puede variar entre 400 y 1600 kg/m³. Entre las aplicaciones más comunes se tienen: relleno, aislamiento

térmico y acústico, aplicaciones de absorción de energía de impacto y resistencia al fuego. El hormigón celular no suele utilizarse como material estructural debido a su baja resistencia a la compresión y baja resistencia a la tensión. Estas limitaciones en sus propiedades han sido superadas con la utilización de fibras de henequén. En las figuras 8a y 8b se muestra una fotografía del hormigón celular mostrando la incorporación de fibras naturales. En la figura 8c se muestra un bloque fabricado con el mismo material celular con refuerzo fibroso (Castillo-Lara, 2020).

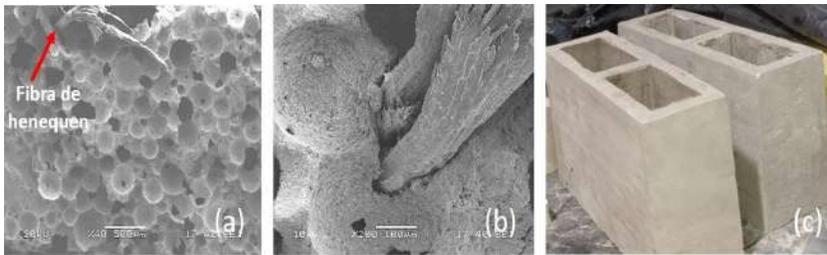


Figura 8. Imagen del concreto celular mostrando el tamaño de los poros, así como la presencia de las fibras naturales de refuerzo y un elemento constructivo del mismo material

Conclusiones

La incorporación de fibras naturales a diversas matrices, tanto poliméricas como cementicias, resulta en materiales compuestos con propiedades mejoradas. En el caso del polímero reforzado, su resistencia a la tensión incrementó 25% y el mortero a base de cemento la resistencia a la compresión incrementó un 40%, aproximadamente. Esto prueba que la utilización de fibras naturales en la elaboración de materiales compuestos es una alternativa muy atractiva para ese producto proveniente de un agave.

Referencias

- Abdelmouleh, M., Boufi, S., Belgacem, M.N. & Dufresne, A., (2007). Short natural-fibre reinforced polyethylenereinforced andpolyethylene naturaland natural rubber composites: Effect of silane coupling agents and fibres loading. *Composites Science and Technology*, (67), 1627–1639. doi:10.1016/j.compscitech.2006.07.003.
- Abdelmouleh, M., Boufi, S., Belgacem, M.N., Dufresne, A. & Gandini, A., (2005). Modification of cellulose fibers with functionalized silanes: Effect of the fiber treatment on the mechanical performances of cellulose-thermoset composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 3(98), 974–984. doi:10.1002/app.22133.
- Castillo-Lara, J. F., Flores-Johnson, E. A., Valadez-Gonzalez, A., Herrera-Franco, P. J., Carrillo, J. G., Gonzalez-Chi, P. I., & Li, Q. M. (2020). Mechanical Properties of Natural Fiber Reinforced Foamed Concrete. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(14), 3060. <https://doi.org/10.3390/ma13143060>
- Netravali, A.N. & Chabba, S. (2003). Composites get greener. *Materials Today*, 6(64), 22–26. DOI: 10.1016/S1369-7021(03)00427-9
- Valadez-González, A., Cervantes-Uc, J.M., Olayo, R. & Herrera-Franco, P.J.,(1999b). Chemical modification of henequén fibers with an organosilane coupling agent. *Composites Part B: Engineering*, 30(3), 321–331. doi:10.1016/S1359-8368(98)00055-9.

4.2 PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y MECÁNICAS DE BIOCOSMOS DE PLA/FIBRAS DE AGAVE FABRICADOS MEDIANTE MDF

Tania Diaz Vidal¹, Valeria Figueroa Velarde¹ y Luis Carlos Rosales Rivera^{*}

RESUMEN

El presente trabajo describe la fabricación de filamentos de PLA/ fibras de agave en diferentes proporciones (0, 3, 5 y 10% p/p) por tecnología de impresión 3D mediante la técnica de modelado por deposición fundida (MDF). Se estudió el efecto de la proporción de fibras de agave y los ángulos de impresión en la morfología y resistencia de las piezas finales. Las propiedades de tensión y flexión de las piezas finales obtenidas mediante impresión 3D fueron analizadas de acuerdo con normas ASTM. Los filamentos PLA/Fibra de agave tuvieron un diámetro promedio de 1.7 mm. La presencia de huecos en los filamentos tuvo un impacto negativo en las pruebas mecánicas de tensión. Las piezas mostraron valores de resistencia a la tracción entre 30 y 50 MPa y esfuerzo de flexión entre 50 y 90 MPa, los cuales disminuyeron conforme aumentaba la concentración de fibras de agave. Sin embargo, estos valores de resistencia no se vieron especialmente afectados por el ángulo de impresión empleado. Las piezas obtenidas en este trabajo pueden ser destinadas para materiales cuya aplicación no requiera una alta resistencia.

PALABRAS CLAVE: Fibras de agave, mdf, modelado por deposición fundida, impresión 3D.

¹ Universidad de Guadalajara, Departamento de Ingeniería Química, Blvd. M. García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México 44430.

*carlos.rosales@academicos.udg.mx

Introducción

La formación de estructuras en 3D mediante un ensamblado capa por capa, el cual puede ser realizado al momento y a partir de un diseño digital, se le conoce como manufactura aditiva (MA) (Rasiya *et al.*, 2021). La MA permite construir piezas de alta resolución, con aplicaciones que van desde la elaboración de modelos de sacrificio para la industria de la fundición y la joyería, a la fabricación de piezas plásticas, metálicas, cerámicas, etc. para la industria automotriz, biomédica y aeroespacial (Lim *et al.*, 2016). Una de las tecnologías de MA más empleadas es la tecnología de modelado por deposición fundida (MDF), que consiste en la extrusión de filamentos de plástico fundido y posterior deposición selectiva del material a través de una boquilla a temperaturas cercanas al punto de fusión del material. La deposición se realiza en configuraciones y orientaciones predeterminadas, las cuales repercuten en las propiedades finales de la pieza (Ahn *et al.*, 2002). Desarrollada por Scott Crump, la tecnología MDF empezó a ser comercializada por la compañía Stratasys Incorporated® en los años 90. A partir del vencimiento de las patentes, el desarrollo de alternativas económicas ha permitido el crecimiento exponencial de equipos y aplicaciones (Noorani, 2006). Las piezas obtenidas por MDF tienen una mayor complejidad, son hechas a la medida y, en menor tiempo, con menos residuos y en condiciones de trabajo estándares (temperatura, humedad, etc.). Además, los equipos son baratos y de fácil operación, por lo que esta tecnología es accesible para casi cualquier usuario (Krapež Tomec & Kariž, 2022).

En el MDF los polímeros más comúnmente utilizados contienen ácido poliláctico o PLA y acrilonitrilo butadieno estireno (ABS). Sin embargo, gracias a la versatilidad del MDF se pueden usar otros materiales como poliestireno de alto impacto (HIPS), poliuretano termoplástico (TPU), nylon o policarbonato (PC), entre otros. Además, es posible usar mezclas poliméricas de reciclado o materiales compuestos que incorporen fibras sintéticas (compositos) o naturales (biocompositos) (Chung *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2022). Una estrategia amigable con el medio ambiente es la combinación de materiales plásticos con fibras

de origen natural para la fabricación de biocompositos. Las fibras naturales como el lino, cáñamo, yute, sisal, etc., son interesantes para este fin gracias a sus propiedades morfológicas y mecánicas. En algunos casos, el precio por kilo de fibra natural es menor y muy competitivo en comparación con las fibras convencionales (como, por ejemplo, la fibra de vidrio) (Bourmaud *et al.*, 2018). La fibra de agave o bagazo de agave (uno de los mayores deshechos de la industria tequilera) es una alternativa como reforzante debido a que comparte las mismas características morfológicas y mecánicas de algunas fibras naturales comerciales (coco, jute, pino, etc.) (Faruk *et al.*, 2012).

En este trabajo se fabricaron filamentos de PLA y fibras de agave (0, 3, 5, 10% p/p) mediante la tecnología de MDF, usando diferentes ángulos en la deposición de estos y se llevó a cabo su caracterización morfológica mediante microscopía SEM y mediante pruebas mecánicas de tensión y flexión.

Materiales y métodos

El esquema más simple para la fabricación de piezas por MDF sigue 7 pasos principales (Gibson *et al.*, 2015):

- a. Diseño de la pieza a imprimir: el diseño 3D de la pieza es creado con un programa de computadora. Este paso se le conoce como diseño asistido por computadora (o CAD por sus siglas en inglés)².
- b. Transferencia de la geometría a la máquina de MDF y determinación de los parámetros de procesamiento: el archivo es transferido al programa de manipulación para archivos stl³. Este paso permite confirmar la orientación, tamaño y posición de construcción de la pieza final. Además, en este paso se usará

² Los programas más comunes y sin licencia para este fin son Sketchup, TinkerCAD, Blender, etc. Algunos programas con licencia son AutoCAD, SolidWorks y Rhinoceros. Muchos de los softwares anteriores convierten el diseño a un formato stl, el cual es genérico y permite eliminar cualquier diseño de construcción (color, textura, fondo, etc.), dejando únicamente la geometría de la pieza.

³ Aunque el formato stl es genérico, algunos equipos aceptan otros tipos de formatos

un segundo software conocido como slicer, el cual crea un g-code que contiene instrucciones (forma de impresión, pasos, material, velocidad de deposición, espesor de capa, fuente de energía, temperatura, etc.)⁴.

- c. Construcción: la máquina de MDF lleva a cabo la construcción de la pieza de acuerdo con los parámetros seleccionados y de manera automática⁵.
- d. Remoción de pieza: una vez concluida la etapa de construcción, la pieza se retira de la máquina de MDF para su posterior caracterización mecánica y morfológica.

Materiales

Los PLA Ingeo 3251D y 7001D fueron adquiridos de Nature Works (MN, EUA). Las fibras de *Agave tequilana* Weber var. Azul (en adelante FA) fueron adquiridas en Mundo Agave (Tequila, México) y procesadas de acuerdo con el trabajo de Cisneros-López *et. al.* (2016). Los filamentos de PLA y PLA/FA (3, 5 y 10% p/p) fueron fabricados usando un extrusor de doble husillo Leistritz modelo Micro 27 de 27 mm (Leistritz, Alemania) con una configuración para las 9 zonas (160, 160, 165, 165, 170, 170, 175, 175, 175 °C).

Métodos

Las piezas fueron diseñadas usando el programa Google SketchUp v.16.0.14004 (CA, EUA), de acuerdo con las medidas de las normas ASTM que rigen las pruebas mecánicas de tensión (D638-03), flexión (D790-03), como se muestra en Figura 1.

⁴ El software de posicionamiento y de slicer vienen incluidos con la impresora 3D. Algunos ejemplos bajo licencia son el Ultimaker Cura y Simplify3D; otros ejemplos gratuitos son el Repetier-Host, Slic3r y Replicator-G.

⁵ Las primeras capas son claves para garantizar el éxito, por lo que hay que tener especial cuidado en los primeros momentos de impresión y garantizar que ésta sea correcta.

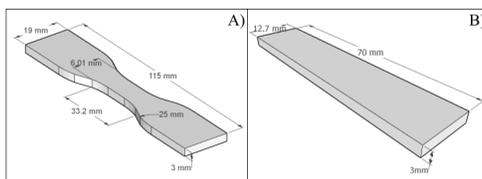
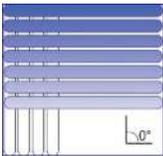
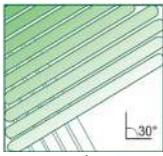
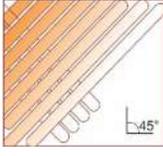
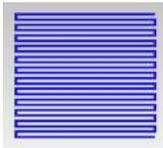


Figura 1. Medidas de las piezas de acuerdo con normas ASTM, A) Tensión, B) Flexión.

Para el posicionamiento de las piezas y la generación del g-code se usaron los programas Repetier-Host v1.6.2 (Hot-World GmbH & Co. KG, Alemania) y Slic3r 3D v.1.2.9, con las configuraciones de la Tabla 1.

Tabla 1. Parametros de impresión 3D usados para la fabricación de todas las piezas

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
	0/90 °		
			
	-60/30 °		
			
	-45/45°		
			
Ángulo de llenado		Tipo de llenado	Rectilíneo
			
Velocidad de impresión	50 mm/s	Espesor de capa	0.3 mm
Temperatura de impresión	190 °C	Temperatura de placa	70 °C
Llenado	100%	Dirección de construcción	Horizontal

Finalmente, las piezas fueron impresas con una impresora 3D Wanhao Duplicator 4 (Jinhua, China) y analizadas sin ninguna modificación adicional.

Morfología

Se obtuvieron micrografías de los filamentos en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) TESCAN modelo Mira3 (Brno, Republica Checa) a una intensidad de 10 kV. Las muestras fueron fracturadas con y sin N₂ líquido y recubiertas con oro por 60 segundos, mediante un equipo de deposición por pulverización catódica SPI Module Sputter Coater (PA, EUA).

Pruebas mecánicas

Para las pruebas de tensión y flexión se usó una máquina universal INSTRON modelo 3345 (MA, EUA). En todas las pruebas se analizaron un total de 10 probetas por composición y ángulo de impresión. Las pruebas de tensión se llevaron a cabo para cada composición y ángulo de impresión de acuerdo con la norma ASTM D638-03 con probetas del tipo IV. Las pruebas de flexión se llevaron a cabo de acuerdo con la norma ASTM D790-03 utilizando un sistema de tres puntos de contacto (Figueroa-Velarde *et al.*, 2021).

Resultados y discusión

El uso de *compositos* o *biocompositos* para la fabricación de filamentos por MDF requiere la presencia de al menos una cantidad de sólidos menor al 40% y de un tamaño de fibras cortas óptimo (0.2-0.4 mm) que permita su paso por la boquilla de impresión (Heidari-Rarani *et al.*, 2019; Tekinalp *et al.*, 2014). En este trabajo se obtuvieron filamentos PLA/FA con un diámetro en promedio de 1.7 mm (± 0.15 mm), independientemente de la cantidad de fibras de agave empleada para la construcción de los filamentos (Figura 2). Mayores porcentajes de FA generaron filamentos de una tonalidad más oscura.

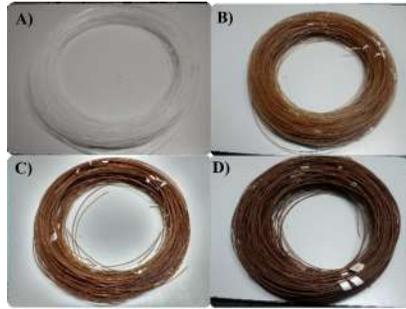


Figura 2. Filamentos de PLA 3251D y fibras de agave A) 0%, B) 3%, C) 5%, y D) 10% p/p.

Microscopia electrónica de barrido

En las piezas impresas por MDF es esperable observar la presencia de huecos, generalmente entre del 4 al 18.5% de la totalidad del material. Estos porcentajes dependen de las características de la impresión, los materiales y las fibras usadas (Franco-Urquiza *et al.*, 2022). En el Figura 3A se observa que las FA usadas presentan formas alargadas irregulares, canales en su interior, con una superficie longitudinal rugosa y daño mecánico en su exterior y en su interior (Hidalgo-Reyes *et al.*, 2015). Estas características y la incompatibilidad entre la matriz y las fibras pueden provocar en la presencia de huecos en las piezas finales, como se puede observar en el Figura 3B.

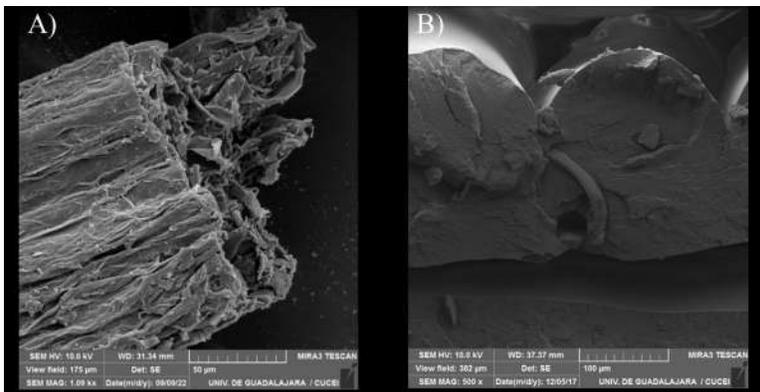


Figura 3. A) Fibra de agave 1,000x de magnificación. B) Detalle de un corte transversal de una pieza obtenida por MDF (PLA/3% FA)

Las piezas finales fabricadas por MDF se detallan en el Figura 4. Al igual que en las fibras, se observa un cambio de coloración desde el semitransparente (para las piezas con 0% fibra de agave) a un color café, el cual aumenta de intensidad conforme aumenta el contenido de FA. Además, la porosidad de las muestras también aumentó de un 7% para PLA (0% fibras de agave) a un 20% (10% de fibra de agave). Esto es debido al efecto intrínseco de la técnica de MDF y a los defectos causados por la presencia de FA, los cuales ya fueron observados en el Figura 2. Una de las mayores desventajas del empleo de fibras naturales es que, debido a su naturaleza, su presencia impacta en la viscosidad y la transferencia del calor, lo que conlleva la impresión de piezas con huecos en su interior (Blok *et al.*, 2018).



Figura 4. Piezas finales fabricadas mediante MDF con A) 0%, B) 3%, C) 5%, y D) 10% p/p fibras de agave/PLA.

Pruebas mecánicas de tensión

Las pruebas mecánicas de tensión son esenciales para predecir el comportamiento de un material cuando es sometido a una fuerza y velocidad predeterminada. Como se puede observar en el Figura 5, las piezas con ambos tipos de PLA (0% fibras agave) mostraron valores muy similares de resistencia a la tracción (~ 50 MPa), sin importar el ángulo de impresión. Estos valores se encuentran por debajo de lo reportado para otras técnicas como compresión y rotomoldeo, en donde se obtuvieron valores en promedio de 59 MPa. La presencia de fibras de agave disminuyó la resistencia a la tensión hasta en un 32% (para las piezas con 10% de fibra de agave). Cabe destacar que

otras tecnologías permiten la impresión de piezas más resistentes a partir de fibras naturales. Por ejemplo, las pérdidas reportadas son menores para rotomoldeo (alrededor del 23%) y extrusión (alrededor del 10%) (Cisneros-López *et al.*, 2018; Pérez-Fonseca *et al.*, 2016). Este fenómeno es debido a la presencia de huecos, los cuales son comunes en la técnica de MDF.

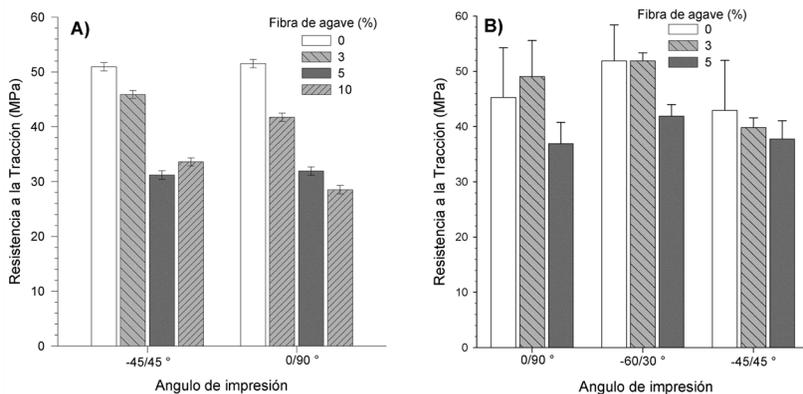


Figura 5. Resistencia a la tracción de PLA A) 3251D, B) 7001D, usando distintos porcentajes de fibra de agave y ángulos de impresión

Pruebas mecánicas de flexión

Las pruebas mecánicas de flexión permiten medir el comportamiento de los materiales impresos ante la presencia de una carga realista que incluye fuerzas de tensión, compresión y cizallamiento. En el caso del esfuerzo de flexión de materiales que incorporan fibras naturales, los valores se encuentran entre 92-95 MPa para otras técnicas de fabricación. Estos valores se ven fuertemente afectados por los ángulos de impresión y el material usado. En este trabajo, las piezas de PLA 3251 y 0% agave dieron valores de resistencia a la flexión entre 84-86 MPa para ambos ángulos, mientras que para las piezas de PLA 7001D (0% fibras de agave) los valores fueron de 90 MPa para un ángulo de 0/90° y de 60 MPa para los otros dos ángulos estudiados. Para ambos tipos de PLA analizados, la presencia de fibras de agave tuvo

un impacto similar, independientemente del ángulo de impresión. En general, la presencia de estas fibras tuvo un impacto negativo en los esfuerzos de flexión, obteniendo una pérdida de resistencia de hasta un $\sim 40\%$ (Figura 6).

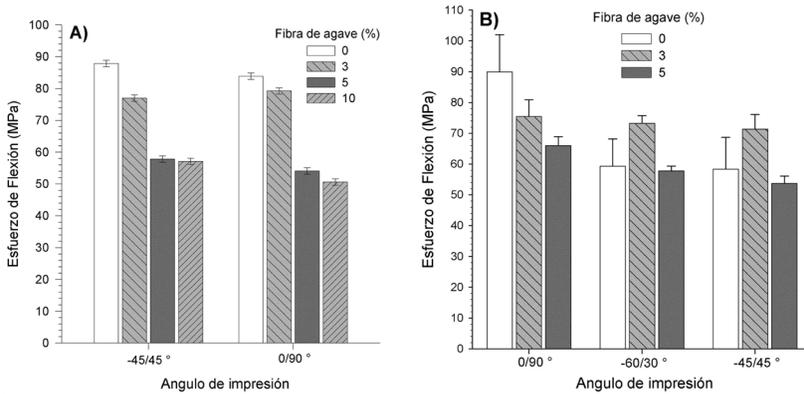


Figura 6. Esfuerzos de flexión de PLA A) 3251D, B) 7001D, para diferentes porcentajes de fibra de agave y ángulos de impresión

Conclusiones

El uso de fibras naturales para la fabricación de materiales, en especial las fibras de desecho como las fibras de agave, es una técnica respetuosa con el medio ambiente. En este trabajo se demostró que estas fibras pueden ser empleadas para la fabricación de piezas plásticas a partir de PLA. Por técnicas microscópicas fue posible visualizar la presencia de huecos en las piezas finales, los cuales eran más prominentes en concentraciones elevadas de FA. Estos defectos, debidos principalmente a la técnica de MDF y a la naturaleza intrínseca de las fibras de agave, tuvieron un impacto negativo en las pruebas de resistencia y tensión mecánica. No obstante, estas piezas pueden ser fabricadas para materiales cuya aplicación no requiera una alta resistencia, como, por ejemplo, juguetes o elementos de decoración.

Referencias

- Ahn, S. H., Montero, M., Odell, D., Roundy, S., & Wright, P. K. (2002). Anisotropic material properties of fused deposition modeling ABS. *Rapid Prototyping Journal*, 8(4), 248–257. <https://doi.org/10.1108/13552540210441166>
- Blok, L. G., Longana, M. L., Yu, H., & Woods, B. K. S. (2018). An investigation into 3D printing of fibre reinforced thermoplastic composites. *Additive Manufacturing*, 22(8), 176–186. <https://doi.org/10.1016/J.ADDMA.2018.04.039>
- Bourmaud, A., Beaugrand, J., Shah, D. U., Placet, V., & Baley, C. (2018). Towards the design of high-performance plant fibre composites. *Progress in Materials Science*, 97, 347–408. <https://doi.org/10.1016/J.PMATSCI.2018.05.005>
- Chung, J. J., Im, H., Kim, S. H., Park, J. W., & Jung, Y. (2020). Toward Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering: 3D Printing Techniques in Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1251. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.586406/BIBTEX>
- Cisneros-López, E. O., González-López, M. E., Pérez-Fonseca, A. A., González-Núñez, R., Rodrigue, D., & Robledo-Ortíz, J. R. (2016). Effect of fiber content and surface treatment on the mechanical properties of natural fiber composites produced by rotomolding. *Composite Interfaces* 24(1), 35–53. <https://doi.org/10.1080/09276440.2016.1184556>.
- Cisneros-López, E. O., Pérez-Fonseca, A. A., González-García, Y., Ramírez-Arreola, D. E., González-Núñez, R., Rodrigue, D., & Robledo-Ortíz, J. R. (2018). Polylactic acid–agave fiber biocomposites produced by rotational molding: A comparative study with compression molding. *Advances in Polymer Technology*, 37(7), 2528–2540. <https://doi.org/10.1002/ADV.21928>.
- Faruk, O., Bledzki, A. K., Fink, H. P., & Sain, M. (2012). Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1552–1596. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2012.04.003>.

- Figueroa-Velarde, V., Diaz-Vidal, T., Cisneros-López, E. O., Roldo-Ortiz, J. R., López-Naranjo, E. J., Ortega-Gudiño, P., & Rosales-Rivera, L. C. (2021). Mechanical and Physicochemical Properties of 3D-Printed Agave Fibers/Poly(lactic) Acid Biocomposites. *Materials (Basel, Switzerland)*, *14*(11). <https://doi.org/10.3390/MA14113111>.
- Franco-Urquiza, E., Leong Sing, S., Sabantina, L., Izwan Ismail, K., Chuen Yap, T., & Ahmed, R. (2022). 3D-Printed Fiber-Reinforced Polymer Composites by Fused Deposition Modelling (FDM): Fiber Length and Fiber Implementation Techniques. *Polymers*, *14*(21), 4659. <https://doi.org/10.3390/POLYM14214659>.
- Gibson, I., Rosen, D., & Stucker, B. (2015). *Additive manufacturing technologies: 3D printing, rapid prototyping, and direct digital manufacturing, second edition. Additive Manufacturing Technologies: 3D Printing, Rapid Prototyping, and Direct Digital Manufacturing, Second Edition*. Springer, 1–498. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2113-3/COVER>.
- Heidari-Rarani, M., Rafiee-Afarani, M., & Zahedi, A. M. (2019). Mechanical characterization of FDM 3D printing of continuous carbon fiber reinforced PLA composites. *Composites Part B: Engineering*, *175*, 107147. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2019.107147>.
- Hidalgo-Reyes, M., Caballero-Caballero, M., Hernández-Gómez, L. H., & Urriolagoitia-Calderón, G. (2015). Chemical and morphological characterization of *Agave angustifolia* bagasse fibers. *Botanical Sciences*, *93*(4), 807–817. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.250>.
- Krapež Tomec, D., & Kariž, M. (2022). Use of Wood in Additive Manufacturing: Review and Future Prospects. *Polymers*, *14*(6), 1174. <https://doi.org/10.3390/POLYM14061174>.
- Lim, C. W. J., Le, K. Q., Lu, Q., & Wong, C. H. (2016). An Overview of 3-D Printing in Manufacturing, Aerospace, and Automotive Industries. *IEEE Potentials*, *35*(4), 18–22. <https://doi.org/10.1109/MPOT.2016.2540098>.
- Noorani, R. (2006). *Rapid prototyping: principles and applications*. 377. <https://www.wiley.com/en-us/Rapid+Prototyping%3A+Principles+and+Applications-p-9780471730019>.

- Park, S., Shou, W., Makatura, L., Matusik, W., & Fu, K. (Kelvin). (2022). 3D printing of polymer composites: Materials, processes, and applications. *Matter*, 5(1), 43–76. <https://doi.org/10.1016/J.MATT.2021.10.018>.
- Pérez-Fonseca, A. A., Robledo-Ortíz, J. R., González-Núñez, R., & Rodrigue, D. (2016). Effect of thermal annealing on the mechanical and thermal properties of polylactic acid-cellulosic fiber biocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(31). <https://doi.org/10.1002/app.43750>.
- Rasiya, G., Shukla, A., & Saran, K. (2021). Additive Manufacturing-A Review. *Materials Today: Proceedings*, 47, 6896–6901. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.05.181>.
- Tekinalp, H. L., Kunc, V., Velez-Garcia, G. M., Duty, C. E., Love, L. J., Naskar, A. K., Blue, C. A., & Ozcan, S. (2014). Highly oriented carbon fiber–polymer composites via additive manufacturing. *Composites Science and Technology*, 105, 144–150. <https://doi.org/10.1016/J.COMPSCITECH.2014.10.009>.

4.3 PRODUCCIÓN DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO A PARTIR DE BAGAZO DE AGAVE: UN CASO DE ESTUDIO A NIVEL PILOTO

José García-Béjar¹, Arturo Sánchez² y Lorena Amaya Delgado^{1*}

RESUMEN

El etanol lignocelulósico representa, hoy en día, una alternativa sostenible frente a los combustibles fósiles. Para su producción mayoritariamente se emplean residuos agroindustriales, como el bagazo de agave generado en el procesamiento del tequila. Sin embargo, para rentabilizar el etanol lignocelulósico es necesario obtener datos de producción a gran escala. En este trabajo se llevó a cabo el pretratamiento de bagazo de agave, su posterior hidrólisis enzimática y fermentación a nivel piloto, empleando dos reactores de 35 y 200 L. Conforme a los resultados obtenidos, se alcanzaron títulos de etanol de 18.462 g L⁻¹ (35 L) y 15.142 g L⁻¹ (200 L), representando productividades de 0.971 g L⁻¹ h⁻¹ y 0.352 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, existiendo claras diferencias entre ambas escalas de producción. El bagazo de agave resulta ser una prometedora materia prima para la generación de etanol lignocelulósico a gran escala.

PALABRAS CLAVE: Bagazo de agave, etanol lignocelulósico, autohidrólisis, escala piloto.

¹ Unidad de Biotecnología Industrial subsede Zapopan del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ). Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México. 45019.

*lamaya@ciatej.mx

² Laboratorio de Futuros en Bioenergía, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Guadalajara, Av. del Bosque 1145, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México. 45019.

Introducción

El sector tequilero es de gran importancia económica para México. De acuerdo con Tetreault et al. (2021), esta industria es responsable del 11.7% del producto interno bruto agrícola nacional, trayendo consigo ganancias de dos mil quinientos millones de dólares en el año 2017 (Sánchez *et al.*, 2017).

Conforme a datos del Consejo Regulador del Tequila, en el año 2022 México produjo 651.4 millones de litros de esta bebida, presentando un incremento del 23.6% en comparación al año anterior (2021). De igual forma, reportan un crecimiento en el consumo de *Agave tequilana* weber variedad azul del 23.9%, resultando en 2 610 000 toneladas de esta especie vegetal. Al mismo tiempo, es preciso resaltar que más allá de la producción de tequila, este tipo de agave es igualmente utilizado para la generación de otros productos, como mieles de agave, fructanos, fibras, entre otras (Álvarez-Chávez *et al.*, 2021), por tanto, es una especie vegetal de gran importancia económica.

No obstante, como toda actividad económica, el sector del tequila genera residuos y subproductos, los cuáles no son completamente aprovechados; por ejemplo, las hojas de agave son desechadas al cosechar las piñas, la vinaza de tequila, que es el residuo líquido proveniente de la destilación (Alemán-Nava *et al.*, 2018) y el bagazo de agave, residuo fibroso que se obtiene al extraer los azúcares, que posteriormente serán utilizados en la fermentación de tequila. El bagazo de agave se compone principalmente por la corteza y la médula fibrovascular dispersa por todo el interior de la cabeza de agave. La fibra es de pared gruesa y larga (10-12 cm) y representa alrededor del 40% del peso total del agave molido respecto al peso húmedo (Iñiguez *et al.*, 2014).

Los residuos agroindustriales, como el bagazo de agave, son una prometedora fuente de obtención de diferentes productos de valor añadido y bioenergéticos. La mayoría de los residuos generados se destinan a vertederos o se eliminan de forma no regulada, causando daños ambientales y pérdidas económicas. Por ello, es necesario desarrollar una gestión sostenible de los mismos. Una utilización completa y consciente del bagazo de agave se propone en el con-

cepto de economía circular para aprovechar los recursos renovables (Beltrán-Ramírez *et al.*, 2019).

Expuesto lo anterior, en los últimos años se han planteado diseños conceptuales de biorrefinerías para el aprovechamiento integral del bagazo de agave, esto debido a que su estructura lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) es una fuente de azúcares fermentables, además de su abundante disponibilidad (Palomo-Briones *et al.*, 2018). La revalorización del bagazo de agave ha permitido el desarrollo de nuevos biomateriales (Ruiz-Martínez *et al.*, 2022), agentes adsorbentes (Cholico-González *et al.*, 2020), y en el contexto del cambio climático, biocombustibles como metano (Arreola-Vargas *et al.*, 2015), hidrógeno (Montiel-Corona *et al.*, 2020), producción de enzimas lignocelulasas (Valle-Pérez *et al.*, 2021) y etanol (Caspeta *et al.*, 2014; Pérez-Pimienta *et al.*, 2017).

El etanol lignocelulósico o de segunda generación es aquel producido mediante la fermentación de los carbohidratos estructurales presentes en las matrices lignocelulósicas, y para su producción es preciso efectuar las siguientes operaciones unitarias.

Pretratamiento: mediante este proceso la biomasa es sometida a cambios físicos, químicos, fisicoquímicos, bioquímicos o combinaciones de estos, para modificar y alterar la estructura lignocelulósica, para así facilitar la despolimerización de los carbohidratos estructurales y la lignina (Abraham *et al.*, 2020). Dentro de la amplia clasificación de tipos de pretratamientos, la autohidrólisis resulta ser una de las opciones más prometedoras para los esquemas de biorrefinería lignocelulósica a gran escala. Esta operación consiste en someter a la biomasa a elevadas temperaturas (140-220 °C) y altas presiones (4.9-20 bar) por breves lapsos (15-30 min), empleando solamente agua y/o vapor de agua (Ruiz *et al.*, 2020), permitiendo la hidrólisis de la hemicelulosa, reducción de la cristalinidad de la celulosa y rompimiento de los polímeros de lignina. Debido a que solamente se emplea agua como catalizador, es una opción ecológica y de bajo costo de operación (Sarker *et al.*, 2021a).

En una segunda etapa, la biomasa pretratada es hidrolizada en azúcares simples o monómeros mediante preparaciones enzimáticas

(principalmente celulasas y xilanasas). Esta operación usualmente se efectúa a temperaturas menores (45-50 °C); sin embargo, las tasas de liberación de azúcares suelen ser lentas, prolongando el proceso hasta 72 h, por ende, actualmente la hidrólisis enzimática o sacarificación suele ser un cuello de botella importante en la industrialización del etanol lignocelulósico.

Los azúcares obtenidos en la operación previa son convertidos a etanol, empleando microorganismos fermentativos. Las levaduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, son los organismos utilizados preferentemente para la fermentación. Sin embargo, debido a la presencia de compuestos inhibitorios de la fermentación, como los ácidos orgánicos, derivados de furano (furfural y 5-hidroximetilfurfural), además de las fracciones fenólicas provenientes de la lignina, hoy en día existe un interés en la bioprospección de nuevos microorganismos con resistencia a estos compuestos, con altas capacidades fermentativas y que posean tolerancia a las robustas condiciones de operación (Bhatia *et al.*, 2017).

Si bien se han desarrollado múltiples avances en cada una de las etapas de producción de etanol lignocelulósico, existe una escasez en reportes de su producción (contemplando las tres principales etapas en conjunto), en ambientes tecnológicamente relevantes, que permitan una mayor consolidación de un esquema de biorrefinería completo, en este caso, del bagazo de agave desechado por el sector del tequila (Figura 1). Por tanto, el objeto de este estudio es evaluar la producción de etanol lignocelulósico a partir de bagazo de agave a nivel piloto.

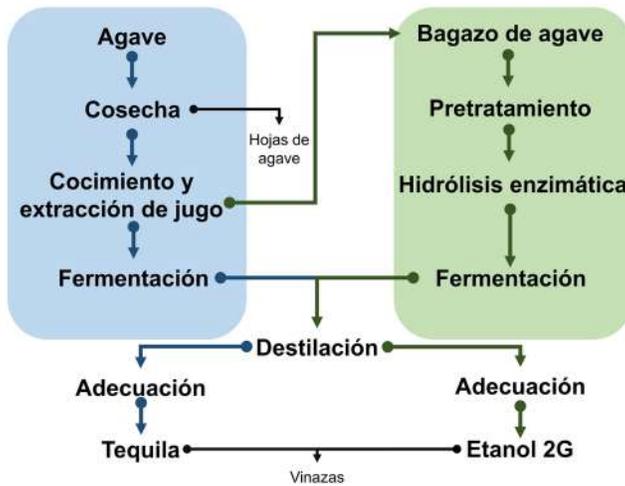


Figura 1. Integración de un esquema de biorrefinería para la producción de etanol lignocelulósico a partir de bagazo de agave

Materiales y métodos

Pretratamiento de bagazo de agave

El bagazo de agave utilizado en este estudio fue gentilmente donado por el Laboratorio de Futuros en Bioenergía del CINVESTAV, unidad Guadalajara. El bagazo de agave fue recolectado de una planta de producción de tequila, previamente sometidos a un proceso de extracción de jugos mediante difusor térmico. Tras su recepción, el bagazo de agave fue secado mediante exposición al sol y reducido de tamaño empleando un molino de martillos (Azteca 301012). Posteriormente, el bagazo molido fue hidratado con agua potable a una relación 1:10 durante 2 h, para posteriormente ser pretratado mediante autohidrólisis (Rodríguez *et al.*, 2019) empleando un reactor tubular piloto (Figura 2). Las condiciones de operación fueron 180 °C, 150 psi, con un tiempo de residencia teórico de 20-40 min (de acuerdo con el lote de procesamiento). Transcurrido el tiempo de operación, el bagazo pretratado fue recolectado y almacenado a 4 °C hasta su

uso. La caracterización de carbohidratos estructurales y lignina se realizó conforme al método de Sluiter *et al.* (2008).

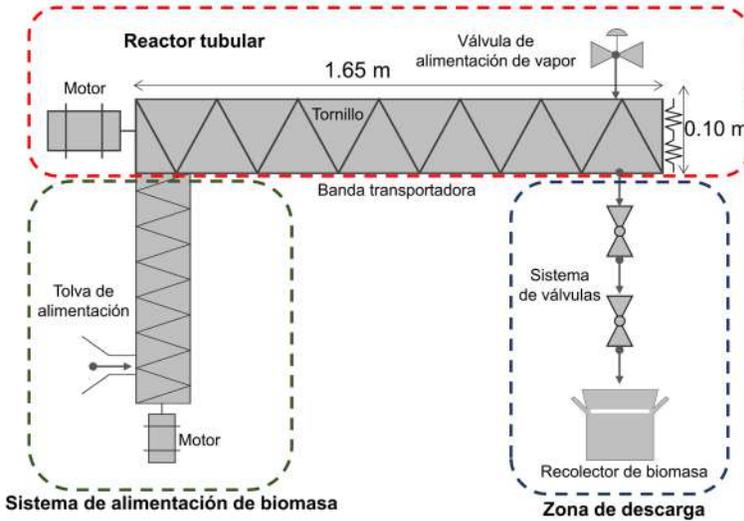


Figura 2. Representación del reactor tubular para pretratamiento de autohidrólisis. Recuperado y modificado de Rodríguez *et al.* (2019). La imagen no se encuentra a escala.

Hidrólisis enzimática de bagazo de agave

Se determinó la humedad del material pretratado, colocando 2 g de muestra en una termobalanza (RADWAG PMR 50/1), llevando el proceso de secado hasta 110 °C. Para las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación se utilizaron dos reactores de tanque agitado de acero inoxidable de 35 y 200 L (R 35-L y R-200 L), provistos con una chaqueta de calentamiento e impulsores del tipo doble hélice (Figura 3).

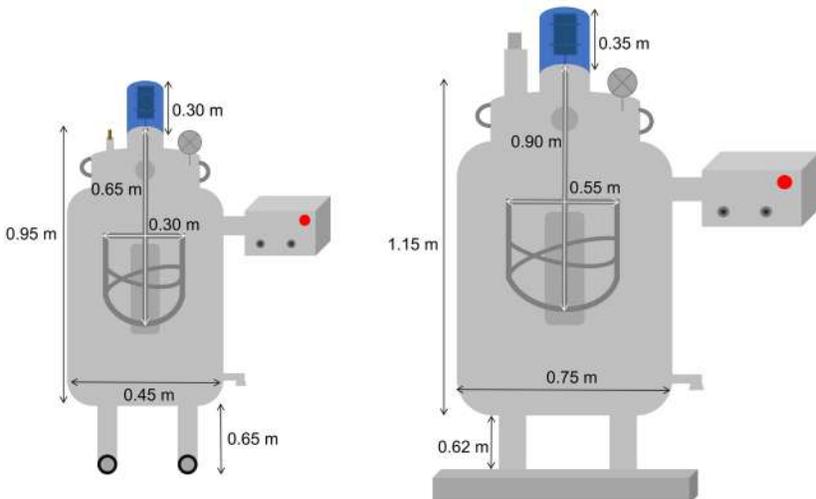


Figura 3. Representación de R 35-L (izquierda) y R 200-L (derecha) utilizados en este estudio. La imagen no se encuentra a escala.

Concerniente a la hidrólisis enzimática, se operó a una carga de sólidos secos de bagazo de agave pretratado del 10% p^{-1} , añadiendo el agua de grifo necesaria para alcanzar dicha concentración, enseguida se ajustó el pH a 5.0. Posteriormente, se adicionaron las preparaciones enzimáticas Cellic® CTec2 y Cellic® HTec2 (Novozymes®, Dinamarca) a una relación del 2.5% v^{-1} (respecto a la cantidad de sólidos secos) de cada coctel enzimático. Las condiciones de operación fueron 50 °C, 100-200 rpm, durante 36-48 h. Durante ambas etapas del proceso se mantuvo constante la velocidad en la punta del impulsor (1.57 m^{-1}) en los dos reactores.

Periódicamente se tomaron muestras para cuantificación de carbohidratos, ácidos orgánicos, derivados de furano y compuestos fenólicos a través de cromatografía de líquidos. El porcentaje de hidrólisis de celulosa se determinó de acuerdo con la ecuación (1).

$$\text{Rendimiento de hidrólisis de celulosa (\%)} = \frac{[\text{Glucosa}] + 1.053[\text{Celobiosa}]}{1.111f [\text{Biomasa}]} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

[Glucosa], [Celobiosa], [Biomasa]: Concentraciones en g L^{-1}

f : Contenido de celulosa en la biomasa en g g^{-1}

La tasa de liberación de glucosa (H_s) se obtuvo a través de la ecuación (2).

$$H_s = \frac{[\text{Glucosa}]}{\text{Tiempo}} \quad (2)$$

Donde:

H_s : Tasa volumétrica de liberación de glucosa en $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

[Glucosa]: Concentración de glucosa en g L^{-1}

[Tiempo]: Tiempo de hidrólisis en h

Fermentación de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave

Transcurrida la hidrólisis enzimática, se redujo la temperatura del sistema a $30\text{ }^\circ\text{C}$ y se ajustó el pH a 4.5 con H_3PO_4 al 75% p v-1, además de suplementar el mosto de fermentación con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Fermont, Mexico) 0.5 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fermont, Mexico) 0.1 g L^{-1} y extracto de levadura (Sigma-Aldrich, EE. UU.) 0.1 g L^{-1} . Previamente, se generó un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red® (Lesaffre, Francia) en medio YPD [glucosa (Sigma-Aldrich, EE. UU) 20 g L^{-1} , Peptona (MCD LAB, México) 20 g L^{-1} y extracto de levadura 10 g L^{-1}] en biorreactores de tanque agitado de 3 y 10 L Applikon® interconectados a una bioconsola Applikon® ez2-Control (Getinge Applikon, Países Bajos). Los hidrolizados enzimáticos fueron inoculados a una concentración de 20×10^6 células mL^{-1} . Constantemente se recolectaron muestras para cuantificación de carbohidratos, ácidos orgánicos, derivados de furano y compuestos fenólicos a través de cromatografía de líquidos, además de etanol y compuestos volátiles por cromatografía de gases. De igual forma, la fermentación fue monitoreada a través de la determinación de azúcares reductores. La

tasa volumétrica de consumo de glucosa (Q_s) fue calculada a través de la ecuación (3).

$$Q_s = \frac{[\text{Glucosa}]}{\text{tiempo}} \quad (3)$$

Donde:

Q_s : Tasa volumétrica de consumo de glucosa en $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

[Glucosa]: Consumo de glucosa durante la fermentación en g L^{-1} .

Tiempo: Tiempo de fermentación donde la glucosa fue consumida completamente en h.

La productividad volumétrica de etanol (Q_P) fue obtenida mediante la ecuación (4).

$$Q_P = \frac{[\text{Etanol}]}{\text{tiempo}} \quad (4)$$

Donde:

Q_P : Productividad volumétrica de etanol en $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

[Etanol]: Concentración de etanol en g L^{-1} .

Tiempo: Tiempo de fermentación donde se determinó la concentración más alta de etanol en h.

Métodos analíticos

La determinación de carbohidratos, ácidos orgánicos, derivados de furano y compuestos fenólicos se realizó mediante cromatografía líquida. La cuantificación de etanol y compuestos volátiles se llevó a cabo a través de cromatografía de gases (Sandoval-Nuñez et al., 2017).

Resultados y discusión

Pretratamiento de bagazo de agave

La operación de pretratamiento de bagazo de agave a través de autohidrólisis requirió el uso de múltiples lotes de procesamiento de dicho residuo; sin embargo, la aproximación promedio de la composición estructural de bagazo de agave ($n=3$) fue de 40.7 ± 4.0 % de celulosa, 16.6 ± 3.8 % de hemicelulosa y 16.3 ± 6.3 % de lignina. Además de los factores intrínsecos de la planta de agave, como la edad y su madurez, las condiciones de cultivo, aspectos edafoclimáticos, entre otras, pueden modificar su contenido de carbohidratos estructurales (Kestur G. *et al.*, 2013; Liñán-Montes *et al.*, 2014); no obstante, existe una variabilidad lote por lote propia del proceso de extracción de jugos.

El bagazo de agave resultante del proceso de autohidrólisis fue recuperado íntegramente, sin generación de co-productos, por ende, la composición estructural se mantuvo constante previo y posterior al pretratamiento. Una de las múltiples ventajas de la autohidrólisis es que únicamente se requiere agua como medio catalizador, provocando la despolimerización de la celulosa y hemicelulosa (Sarker *et al.*, 2021; Ruiz *et al.*, 2013), facilitando así el acceso de las enzimas hidrolíticas en la etapa de sacarificación sin generar corrientes de desecho.

Hidrólisis enzimática de bagazo de agave

El bagazo de agave pretratado fue hidrolizado enzimáticamente en dos biorreactores de 35 L (R 35-L) y 200 L (R 200-L). La Figura 4 muestra el perfil cinético de liberación de azúcares en ambos reactores. De acuerdo con el comportamiento de hidrólisis de azúcares, se observa que, en ambos reactores, la tasa máxima de obtención de azúcares se detectó en las primeras 12 h de reacción, alcanzando su estabilidad posterior a las 24 h.

Con respecto a la glucosa, en R 35-L se detectó una concentración de 35.61 g L^{-1} posterior a las 40 h, representando un 31.1% más en comparación al R 200-L (27.16 g L^{-1} de glucosa). En términos de

rendimiento, se obtuvo un porcentaje de hidrólisis de celulosa de 78.7% para R 35-L y del 42.8% para R 200-L. Las diferencias en los rendimientos de hidrólisis en ambos reactores se deben principalmente a las deficiencias de transferencia de masa y calor que pudieron existir, considerando que la masa de trabajo de R 200-L fue cinco veces mayor que en R-35 L. Para disminuir los efectos de un ineficiente proceso de transferencia en procesos de hidrólisis enzimática a gran escala, se recomienda operar bajo un régimen de lote alimentado, esto con la intención de reducir la inactivación de las enzimas, además de emplear tensoactivos para incrementar la interacción sólido-líquido (Shiva *et al.*, 2022). Otra alternativa para mejorar la eficiencia de hidrólisis enzimática es emplear reactores con disposición horizontal, cuyo principio de mezclado está basado en la caída libre por gravedad de los sólidos en rotación. Du *et al.* (2014) compararon la hidrólisis enzimática de rastrojo de maíz pretratado a altas cargas de sólidos superiores al 20% p p⁻¹ en un tanque agitado vertical con doble impulsor helicoidal y un biorreactor tubular giratorio horizontal, demostrando que la conversión de celulosa era mayor en el biorreactor horizontal en comparación con el tanque agitado.

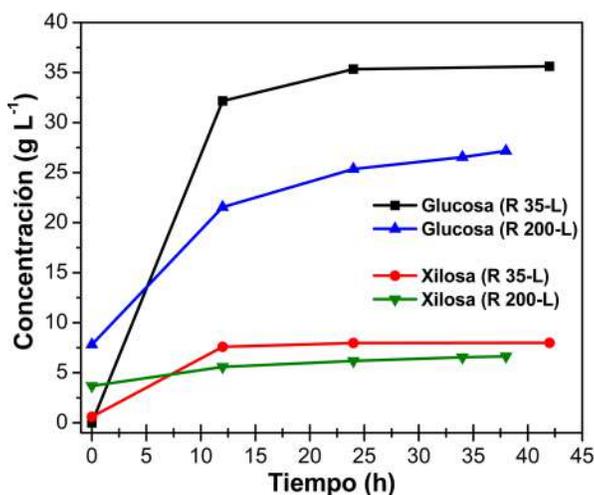


Figura 4. Comportamiento cinético de liberación de azúcares durante hidrólisis enzimática de bagazo de agave en R 35-L y R 200-L.

Respecto a xilosa, en el R 35-L se partió de una concentración inicial de 0.56 g L^{-1} , estabilizándose tras 12 h de hidrólisis, con 7.99 g L^{-1} . Por otra parte, en el R 200-L se cuantificó una concentración de 6.64 g L^{-1} , manteniéndose constante en todo el proceso de sacarificación. La Tabla 1 contiene la composición del hidrolizado enzimático de bagazo de agave en los dos reactores.

Tabla 1. Composición de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave en R 35-L y R 200-L

Compuesto	R 35-L	R 200-L
Azúcares (g L^{-1})		
Glucosa	35.61	27.16
Xilosa	7.99	6.64
Ácidos orgánicos (g L^{-1})		
Ácido acético	2.937	1.722
Ácido fórmico	1.497	0.942
Derivados de furano (mg L^{-1})		
Furfural	122.86	54.96
5-Hidroximetil furfural	83.11	38.86

Las mayores concentraciones de ácidos orgánicos fueron observadas en R 35-L. En el caso del ácido acético, este proviene de la desacetilación de las cadenas de xilano en los procesos de despolimerización. Por otra parte, el ácido fórmico es generado debido a la oxidación catalítica de la xilosa en medio acuoso (Voß *et al.*, 2019). De igual manera, los derivados de furano fueron encontrados en mayor concentración en R 35-L, con concentraciones de hasta 122.86 mg L^{-1} . El furfural y 5-HMF derivan de la deshidratación catalizada en medio ácido de la xilosa y la glucosa, respectivamente (He *et al.*, 2021). Estos compuestos, en conjunto con los ácidos orgánicos y otros derivados fenólicos presentes en los hidrolizados enzimáticos, tienen un fuerte efecto negativo en la fisiología celular del microorganismo fermentativo. Entre los efectos más importantes están la modificación del pH intracelular, incremento de la cantidad de especies reactivas de oxígeno, degradación de proteínas y ácidos nucleicos, impactando en los patrones de consumo de glucosa y producción de etanol (Jönsson *et al.*, 2013).

Fermentación de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave

Los azúcares liberados en la operación de hidrólisis enzimática en ambos reactores fueron utilizados para la producción de etanol, empleando *S. cerevisiae* Ethanol Red® como organismo fermentativo. La Figura 5 muestra los perfiles cinéticos de consumo de azúcares.

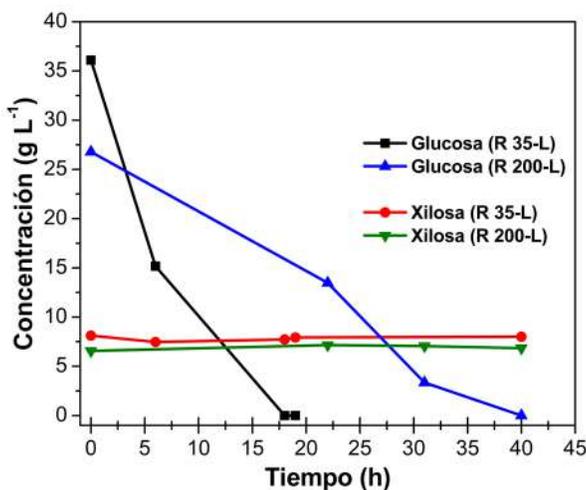


Figura 5. Cinética de consumo de azúcares de *S. cerevisiae* Ethanol Red® en hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave en R 35-L y R 200-L

Como se aprecia en la figura anterior, hubo un consumo completo de la glucosa en ambos reactores; sin embargo, en R 35-L el agotamiento de la glucosa se produjo entre las 18-20 h de fermentación, en cambio, en R 200-L el consumo total se detectó hasta las 40 h de fermentación, el doble de tiempo en comparación con R 35-L.

La concentración de xilosa se mantuvo constante en ambos reactores durante la fermentación, esto debido a que *S. cerevisiae* no tiene la maquinaria metabólica para biotransformar pentosas como la xilosa. Por tal motivo, actualmente existen múltiples esfuerzos en inducir el metabolismo de pentosas en *S. cerevisiae*, y al mismo tiempo, de emplear microorganismos que posean la capacidad innata de fermentar xilosa, por ejemplo, *Pichia stipitis*, *Candida shebatae* o

Debaryomyces hansenii a nivel industrial, esto como parte de un mejor aprovechamiento de los azúcares, y a su vez, de incrementar los títulos y productividades de etanol.

La Tabla 2 contienen la composición de los mostos fermentados en ambos reactores. Se muestra que al final de la fermentación se alcanzaron concentraciones de 1.208 y 0.60 g L⁻¹ de glicerol en R 30-L y R 200-L, respectivamente.

Por otra parte, los ácidos orgánicos no presentaron cambios en concentración; sin embargo, los derivados de furano se redujeron a 12.56 mg L (R 35-L) y 12.97 mg L (R-200 L), representando una reducción de este compuesto del 89.7% y 76.4%, respectivamente. En ambos casos no se detectó 5-HMF en el mosto. Este fenómeno evidencia un proceso de detoxificación del medio por parte de *S. cerevisiae*. Se ha reportado que, en procesos de detoxificación, *S. cerevisiae* puede biotransformar el furfural en alcohol furfurílico. La reducción del furfural se ha relacionado con el consumo del cofactor NADH, mientras que la reducción del 5-HMF se ha encontrado asociada al consumo de NADPH (Jönsson & Martín, 2016; Jönsson *et al.*, 2013). Finalmente, la concentración de etanol, una vez finalizada la fermentación, fue de 18.462 g L⁻¹ para R 35-L y de 15.142 g L⁻¹ para R 200-L. Finalmente, la concentración de etanol, una vez finalizada la fermentación, fue de 18.462 g L⁻¹ para R 35-L y de 15.142 g L⁻¹ para R 200-L.

Tabla 2. Composición de los mostos posterior a la fermentación en R 35-L y R 200-L

Compuesto	R 35-L	R 200-L
Azúcares (g L-1)		
Glucosa	ND	ND
Xilosa	7.933	6.02
Glicerol	1.208	0.600
Ácidos orgánicos (g L-1)		
Ácido acético	2.542	2.015
Ácido fórmico	1.118	0.918
Derivados de furano (mg L-1)		
Furfural	12.56	12.97

5-HMF	ND	ND
Etanol (g L-1)		
Etanol	18.462	15.142
Compuestos volátiles (mg L-1)		
Metanol	68.444	27.552
Isobutanol	26.568	25.175
Alcohol isoamílico	51.998	11.921
Alcohol furfurílico	208.65	101.564

ND: No detectado

La Tabla 3 resume los parámetros cinéticos obtenidos durante los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación en ambos reactores.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de hidrólisis enzimática y fermentación de R 35-L y R 200 L

Reactor	<i>H_s</i> (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Hidrólisis (%)	<i>Q_s</i> (g L ⁻¹ h ⁻¹)	<i>Q_p</i> (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)
35 L	2.680	78.7	1.677	0.971	18.462
200 L	1.795	42.8	0.587	0.352	15.142

H_s: Tasa volumétrica de liberación de glucosa durante hidrólisis enzimática

Q_s: Tasa volumétrica de consumo de glucosa durante fermentación

Q_p: Tasa volumétrica de producción de etanol durante fermentación

En correspondencia a la Tabla 3, la tasa de liberación de azúcares fue un 48.3% mayor en R 35-L, en comparación a R 200-L. Por otra parte, en la etapa de fermentación se aprecia que la tasa de volumétrica de consumo de glucosa (*Q_s*) y la tasa volumétrica de producción de etanol (*Q_p*) fueron tres veces mayor en R 35-L, mostrando evidencia de que existen diferencias sustanciales al momento de incrementar la escala de producción de etanol lignocelulósico.

Conclusiones

El bagazo de agave resultante de la producción de tequila es una prometedora fuente de azúcares para la obtención de etanol lignocelulósico. Desde una perspectiva de biorrefinería, son necesarios

los estudios de producción de etanol lignocelulósico a escala piloto que permitan una mejor comprensión de estos procesos en entornos tecnológicamente relevantes; es decir, lo más apegado a un proceso industrial. En este trabajo se evidencia las diferencias en los rendimientos de productividad de azúcares fermentables y obtención de etanol que pueden existir al incrementar la escala del proceso de 35 a 200 L. Estas discrepancias pueden ser atribuidas a deficiencias en los procesos de transferencia de calor y masa, principalmente. Como una recomendación y perspectiva a mediano plazo, se contempla el operar a mayores cargas de sólidos a través de múltiples alimentaciones, para así incrementar la cantidad de azúcares fermentables, además de optar por microorganismos con mejores capacidades fermentativas en hidrolizados enzimáticos.

Referencias

- Abraham, A., Mathew, A. K., Park, H., Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., Pandey, A., Park, J. H., & Sang, B. I. (2020). Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122725>
- Alemán-Nava, G. S., Gatti, I. A., Parra-Saldivar, R., Dallemand, J. F., Rittmann, B. E., & Iqbal, H. M. N. (2018). Biotechnological revalorization of Tequila waste and by-product streams for cleaner production – A review from bio-refinery perspective. *Journal of Cleaner Production*, 172, 3713–3720. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.134>
- Álvarez-Chávez, J., Villamiel, M., Santos-Zea, L., & Ramírez-Jiménez, A. K. (2021). Agave By-Products: An Overview of Their Nutraceutical Value, Current Applications, and Processing Methods. *Polysaccharides*, 2(3), 720–743. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030044>
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R. I., Alatríste-Mondragón, F., & Méndez-Acosta, H. O. (2015). Methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and me-

- thane yield. *Bioresource Technology*, 181, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>
- Beltrán-Ramírez, F., Orona-Tamayo, D., Cornejo-Corona, I., González-Cervantes, J. L. N., Esparza-Claudio, J. J., & Quintana-Rodríguez, E. (2019). Agro-Industrial Waste Revalorization: The Growing Biorefinery. En A. Abomohra (ed.), *Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83569>
- Bhatia, S. K., Kim, S. H., Yoon, J. J., & Yang, Y. H. (2017). Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. *Energy Conversion and Management*, 148, 1142–1156 Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.073>
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. A., Ponce-Noyola, T., & Martínez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Cholico-González, D., Ortiz Lara, N., Fernández Macedo, A. M., & Chavez Salas, J. (2020). Adsorption Behavior of Pb(II), Cd(II), and Zn(II) onto Agave Bagasse, Characterization, and Mechanism. *ACS Omega*, 5(7), 3302–3314. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03385>
- Du, J., Zhang, F., Li, Y., Zhang, H., Liang, J., Zheng, H., & Huang, H. (2014). Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations in a horizontal rotating bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2), 173–181. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0983-6>
- He, O., Zhang, Y., Wang, P., Liu, L., Wang, Q., Yang, N., Li, W., Champagne, P., & Yu, H. (2021). Experimental and kinetic study on the production of furfural and HMF from glucose. *Catalysts*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/catal11010011>
- Iñiguez, C. G., Bernal, C. J. J., Ramírez, M. W., & Villalvazo, N. J. (2014). Recycling Agave Bagasse of the Tequila Industry. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 04(2), 135–142. <https://doi.org/10.4236/aces.2014.42016>

- Jönsson, L. J., Alriksson, B., & Nilvebrant, N. O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Kestur G., S., Flores-Sahagun, T. H. S., Dos Santos, L. P., Dos Santos, J., Mazzaro, I., & Mikowski, A. (2013). Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 45, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2012.09.001>
- Liñán-Montes, A., De La Parra-Arciniega, S. M., Garza-González, M. T., García-Reyes, R. B., Soto-Regalado, E., & Cerino-Córdova, F. J. (2014). Characterization and thermal analysis of agave bagasse and malt spent grain. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115(1), 751–758. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3321-y>
- Montiel-Corona, V., Palomo-Briones, R., & Razo-Flores, E. (2020). Continuous thermophilic hydrogen production from an enzymatic hydrolysate of agave bagasse: Inoculum origin, homoacetogenesis and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, 306. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123087>
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K. L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J. A., Cortés-Carmona, M. Á., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2018). Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7), 1423–1441. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1421-2>
- Pérez-Pimienta, J. A., Vargas-Tah, A., López-Ortega, K. M., Medina-López, Y. N., Mendoza-Pérez, J. A., Avila, S., Singh, S., Simmons, B. A., Loaces, I., & Martinez, A. (2017). Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology*, 225, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.064>

- Rodríguez, F., Sanchez, A., & Amaya-Delgado, L. (2019). Xylooligosaccharides production from lignocellulosic biomass using a pilot-scale pretreatment continuous tubular reactor. Modelling and experimental validation. *Industrial Crops and Products*, 134, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.058>
- Ruiz, H. A., Conrad, M., Sun, S. N., Sanchez, A., Rocha, G. J. M., Romani, A., Castro, E., Torres, A., Rodríguez-Jasso, R. M., Andrade, L. P., Smirnova, I., Sun, R. C., & Meyer, A. S. (2020). Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 299. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122685>
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.069>
- Ruiz-Martínez, I. G., Rodrigue, D., Arenas-Ocampo, M. L., Camacho-Díaz, B. H., Avila-Reyes, S. V., & Solorza-Feria, J. (2022). Production and Characterization of Gelatin Biomaterials Based on Agave Microfibers and Bentonite as Reinforcements. *Foods*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/foods11111573>
- Sánchez, A., Sánchez, S., Dueñas, P., Hernández-Sánchez, P., & Guadalajara, Y. (2020). The Role of Sustainability Analysis in the Revalorization of Tequila Residues and Wastes Using Biorefineries. *Waste and Biomass Valorization*, 11(2), 701–713. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00756-0>
- Sandoval-Núñez, D., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., Arrizon, J., & Amaya-Delgado, L. (2017). A comparative study of lignocellulosic ethanol productivities by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20, 1491–1499. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1470-6>
- Sarker, T. R., Pattnaik, F., Nanda, S., Dalai, A. K., Meda, V., & Naik, S. (2021a). Hydrothermal pretreatment technologies for ligno-

- cellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. *Chemosphere*, 284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131372>.
- Sarker, T. R., Pattnaik, F., Nanda, S., Dalai, A. K., Meda, V., & Naik, S. (2021b). Hydrothermal pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. *Chemosphere*, 284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131372>.
- Shiva, Climent Barba, F., Rodríguez-Jasso, R. M., Sukumaran, R. K., & Ruiz, H. A. (2022). High-solids loading processing for an integrated lignocellulosic biorefinery: Effects of transport phenomena and rheology –A review. *Bioresource Technology*, 351. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127044>.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011)*. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html
- Tetreault, D., McCulligh, C., & Lucio, C. (2021). Distilling agro-extractivism: Agave and tequila production in Mexico. *Journal of Agrarian Change*, 21(2), 219–241. <https://doi.org/10.1111/JOAC.12402>.
- Voß, D., Pickel, H., & Albert, J. (2019). Improving the Fractionated Catalytic Oxidation of Lignocellulosic Biomass to Formic Acid and Cellulose by Using Design of Experiments. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(11), 9754–9762. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05095>.

4.4 VALORIZACIÓN DE BAGAZO DE AGAVE MEDIANTE LA CREACIÓN DE BIORREFINERÍAS

Jacobo Pérez-Barragán¹, Octavio García-Depraect^{2,3}, Rafael Maya-Yescas⁴, Ramiro Vallejo-Rodríguez, Elizabeth León-Becerril*

El tequila: proceso de producción y residuos principales

El tequila es un icono de la cultura y tradiciones de México, de alta importancia económica en el país y para los estados productores con denominación de origen, entre los que destaca Jalisco como principal productor, seguido de Guanajuato, Nayarit, Michoacán y Tamaulipas. La industria tequilera representa la segunda actividad económica más importante en el ramo de bebidas alcohólicas, alcanzando una producción de 651.4 millones de litros para el 2022 (CRT, 2022), cuya derrama económica asciende a 55 000 mil millones de pesos, involucrando a más de 13 000 agricultores, 158 empresas certificadas por el Consejo Regulador del Tequila y 70 000 familias empleadas (CNIT, 2022).

¿Cómo se produce el tequila? El tequila se obtiene de la extracción, fermentación y destilación del jugo de piña del *Agave tequilana* Weber var. azul. La especie es una planta xerófila (crece en zonas áridas y cálidas) de hojas color azul-verdoso, delgadas y casi planas, mide aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho, con una

¹ Departamento de Tecnología Ambiental, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, México. *eleon@ciatej.mx

² Instituto de Procesos Sostenibles, Universidad de Valladolid, Dr. Mergelina s/n., Valladolid, 47011, España.

³ Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Ambiental, Universidad de Valladolid, Dr. Mergelina s/n., Valladolid 47011, España.

⁴ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, 58030. Morelia, Michoacán de Ocampo, México

espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm (Iñiguez *et al.*, 2014). De manera general, una vez obtenidas las piñas de agave de la jima (cosecha), estas son transportadas para su procesamiento (Figura 1). Las piñas con un alto contenido de azúcares (25–30% del peso en azúcares) se someten tradicionalmente a un proceso de cocción, cuya finalidad es la transformación de carbohidratos a azúcares más simples y para suavizar las piñas y facilitar el proceso de extracción; esta etapa se lleva a cabo en hornos o autoclaves. Posteriormente, se realiza la extracción de los azúcares utilizando trenes de molienda de varias etapas. Subsecuentemente, se realiza la etapa de fermentación para la transformación biológica de los azúcares en alcohol etílico y otros compuestos que contribuirán a las características sensoriales de la bebida, finalizando con las etapas de destilación y maduración del tequila para consumo final (Gallardo-Valdez *et al.*, 2015).

En la actualidad, se propone la sustitución de las etapas de cocción y molienda por un proceso de lavado sistemático de agua a contracorriente que disuelve el azúcar contenido en las fibras de agave previamente desgarradas, usando difusores. Esta técnica supone una mayor eficiencia en recuperación de azúcares, además de un proceso extractivo menos agresivo que permite tener control sobre algunas características indeseables, principalmente organolépticas, sobre el producto final. Independientemente del proceso utilizado, durante la producción del tequila se generan dos residuos principales: las vinazas tequileras y el bagazo de agave (BA). Las vinazas son el residuo líquido que se genera y queda en el fondo del alambique luego de la fermentación del mosto de agave. Las vinazas son de color oscuro por su alto contenido de fenoles y melanoidinas. Mientras que el BA es un residuo sólido, generado durante la etapa de extracción de jugos de las cabezas de agave. Por cada litro de tequila producido se generan de 10 a 12 litros de vinazas y de 1.4 a 2 kg de BA (López-López *et al.*, 2010). Bajo esta base de cálculo se estima que la producción de tequila en el 2022 (651.4 millones de litros) generó 912 000 toneladas de BA. En particular, en lo que se refiere al BA, generalmente es apilado o repartido en campos de cultivo, provocando malos olores, lixiviados y generación de plagas. Actualmente existe la necesidad de convertir al BA en productos de valor agregado y de interés comercial como biocombustibles bajo un esquema de biorrefinería.



Figura 1. Esquema general del proceso de producción del tequila

Bagazo de agave: características y usos comunes

El BA es el material fibroso residual que queda después del cultivo y procesamiento del *Agave tequilana* Weber var. azul. El bagazo es un material fibroso, la cáscara y haces fibrovasculares dispersos por todo el interior de la cabeza del agave están compuestos de fibra (paredes gruesas y largas de 10–12 cm) y médula (Iñiguez *et al.*, 2014). La Tabla 1 presenta las características físicas y químicas principales del BA.

Tabla 1. Principales características físicas y químicas del bagazo de agave (Brandt *et al.*, 2013; Palomo-Briones *et al.*, 2018)

Características físicas	
Color	Café/amarillo
Longitud de la fibra (cm)	5-10
Diámetro de la fibra (mm)	0.3-0.4
Capacidad de absorción de agua (mL./g)	6
Características químicas (%)	
Celulosa	30–50
Hemicelulosa	15–30
Lignina	15–35
Nitrógeno total	2–5
Pectinas	1–2
Grasas	1–2
Azúcares reductores	4–8
Cenizas	3–7
Otros	1–6

Una pequeña cantidad del BA generado es usada como alimento para animales, fertilizantes, y en la fabricación de ladrillos, colchones, muebles y materiales de embalaje; en la actualidad, bajo un esquema de biorrefinería, el BA puede ser valorizado para la generación de biocombustibles (Figura 2). En términos prácticos, una biorrefinería es una plataforma que consta de una serie de procesos biológicos-físico-químicos integrados para la conversión de biomasa en combustibles, materiales y productos de alto valor agregado.

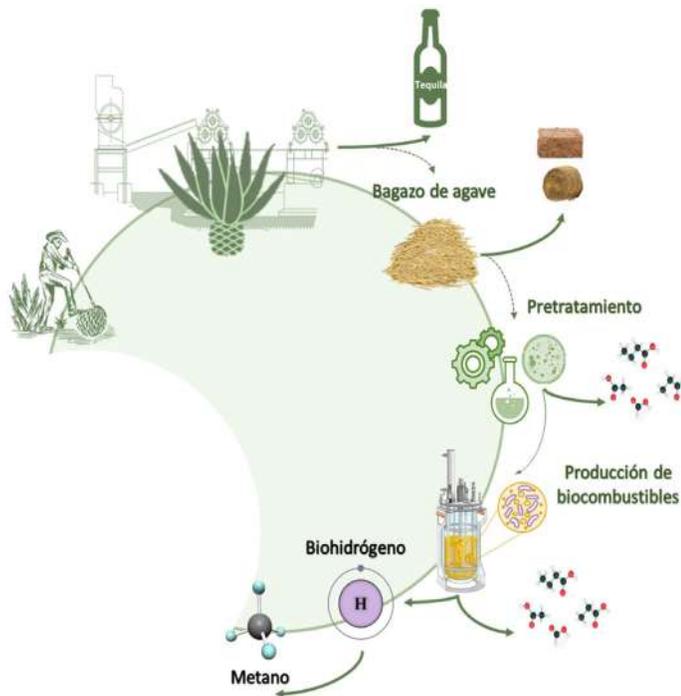


Figura 2. Valorización del bagazo de agave mediante la obtención de productos y subproductos de valor agregado

Alimentación para ganado

El nivel de utilidad del BA depende del aprovechamiento de la microflora rumiante, su contenido en lignina limita la degradación de la

celulosa por parte de los microorganismos. El uso de la celulosa y los subproductos agrícolas lignocelulósicos está limitado por la estrecha asociación entre los carbohidratos estructurales y la lignina, además de la disposición cristalina del polímero de celulosa en las paredes celulares de las plantas. Para contrarrestar esta limitación, se puede iniciar con la separación física de los componentes que tienen digestibilidad baja como la fibra y luego aquellos con digestibilidad más alta como la médula (Cedeño, 1995). La médula del BA implica un consumo inmediato para evitar su descomposición; una alternativa de conservación es el ensilaje. El ensilaje permite conservar forrajes por fermentación láctica del pasto con producción de ácido láctico a pH por debajo de 5, manteniendo las cualidades nutritivas originales del pasto.

Materiales compuestos

Una vez aprovechada la médula, el BA puede ser utilizado para la elaboración de materiales compuestos. Íñiguez *et al.* (2001) prepararon muestras de tableros de media y alta densidad con fibras cortas y largas de BA con propiedades similares a las de los tableros preparados con fibras y partículas de madera.

Propósitos agrícolas

El BA puede ser aprovechado como sustrato para fines agrícolas, siempre y cuando la fibra no se degrade completamente en el proceso de compostaje. Estudios han demostrado que la composta de BA produce efectos similares o mejores en la producción y calidad de los cultivos. Íñiguez *et al.* (2011) no encontraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.5$) en una prueba de invernadero de producción de tomates al utilizar dos sustratos de composta de BA y dos sustratos comerciales. Rodríguez *et al.* (2013) encontraron resultados similares al evaluar composta de BA para la producción de plántulas de tomate, con mejores valores de altura, peso seco y fresco.

Además de las aplicaciones mencionadas del BA, en el contexto del cambio climático y en la búsqueda de energías renovables, de

acuerdo con el séptimo objetivo de la Agenda 2030 sobre el Desarrollo Sostenible, referente a la energía asequible y no contaminante (ONU, 2023), el BA es una materia prima potencial para producir productos de valor agregado y biocombustibles en un esquema de biorrefinería.

Valorización del bagazo de agave en un esquema de biorrefinería

En la actualidad, el BA se postula como una materia prima potencial para la obtención de bioenergía con grandes ventajas, iniciando por su procedencia a partir del agave y su potencial de cultivo. En este sentido, el cultivo de agave, en comparación con otros materiales lignocelulósicos como rastrojo de maíz (*Zea mays* L.), bagazo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), pasto varilla (*Panicum virgatum* L.), etc., tiene grandes ventajas entre las que destacan un bajo requerimiento de agua, alta productividad en tierras semiáridas y adaptabilidad a altas temperaturas. En términos de productividad, el agave puede alcanzar hasta 40 ton/ha por año, que es hasta 13 veces mayor a la productividad del rastrojo de maíz (Pérez-Pimienta *et al.*, 2017a). A pesar de estas ventajas, al ser el agave un cultivo regional, limita la generación de BA como materia prima y obliga a la regionalización y descentralización de las propuestas de biorrefinerías.

La utilización del BA como materia prima en un esquema de biorrefinería debe cumplir entonces con su integración en el conjunto de procesos para la obtención de biocombustibles y productos químicos (derivados de lignina, ácidos grasos volátiles, fibras residuales). En este sentido, en los esquemas de biorrefinería se plantea una etapa de refinación primaria, en la que se obtienen los carbohidratos solubles fermentables a partir del BA, y una etapa de refinación secundaria, en la que los carbohidratos son usados para la obtención de biocombustibles y productos de alto valor agregado por procesos biológicos (Figura 3).

Pocos son los trabajos que sugieren propuestas de biorrefinerías para BA mediante un análisis tecno-económico de los procesos y más aún un análisis exhaustivo de la viabilidad y sustentabilidad de

los esquemas. Por ejemplo, Sánchez *et al.* (2020) proponen utilizar estos residuos y las vinazas tequileras como múltiples materias primas para co-producir bioetanol de segunda generación y electricidad. El análisis de sostenibilidad para este caso cuantifica, además, el impacto ambiental y lo compara con aspectos económicos bajo una visión unificada. Los resultados muestran que el costo de tratar los residuos equivale a un tercio del costo total de producción de bioetanol. Aún más limitados son los estudios dirigidos a la revalorización de sub-productos de recuperación en los procesos de obtención de biocombustibles, como la lignina. A partir de trabajos anteriores, se estima que una recuperación de hasta 112 kg de lignina por tonelada de BA puede ser obtenida (Palomo-Briones *et al.*, 2018). Sin embargo, la viabilidad de conversión de lignina a productos de valor agregado es limitada. Actualmente, sólo la vainillina es producida a escala industrial a partir de lignina de maderas blandas. En trabajos anteriores se ha demostrado que las fuentes vegetales que no pertenecen al grupo de maderas blandas o duras tienen una mayor abundancia de alquenos, algunas alcanzan un rendimiento en peso de aldehídos del 10 al 15%, incluyendo a la vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) cuando las ligninas se oxidan utilizando aire como oxidante (Silverman *et al.*, 2019).

El presente trabajo no profundiza en el análisis tecno-económico de los procesos ni de su sustentabilidad; sin embargo, pretende proporcionar un panorama general y algunas de las principales directrices. A continuación, se presenta una visión de: a) los tipos de pretratamiento involucrados en la etapa de refinación primaria para el aprovechamiento del BA; y en la etapa de refinación secundaria: b) la producción de hidrógeno por fermentación oscura; c) la producción de metano por digestión anaerobia y d) las limitaciones y perspectivas de investigación.

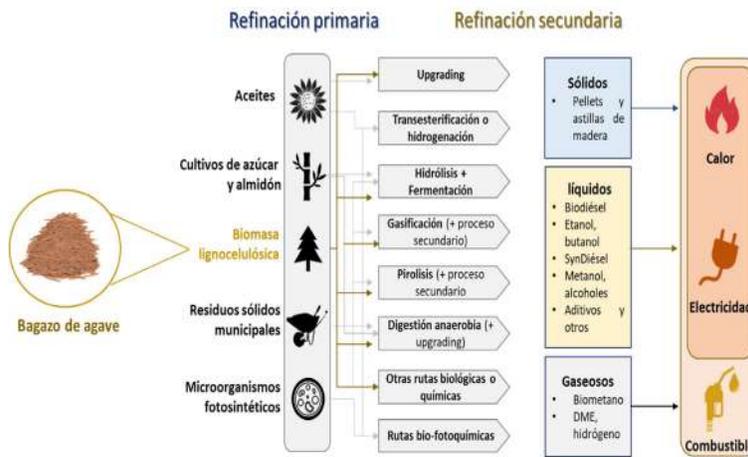


Figura 3. Integración del bagazo de agave en el esquema actual de biorrefinerías

Pretratamientos

Debido a la composición de su estructura compuesta por lignina, hemicelulosa y celulosa, es necesario someter al material a una etapa de pretratamiento para mejorar su biodegradabilidad para que pueda ser utilizado para la producción de biocombustibles mediante procesos biológicos. Un pretratamiento se considera eficaz si la etapa previa de acondicionamiento de la materia prima no es compleja o costosa energéticamente, baja degradación de azúcares y formación de productos potencialmente inhibidores, entre otros. La Tabla 2 resume los pretratamientos más utilizados comúnmente, así como sus ventajas y desventajas.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de pretratamientos más comunes de biomasa lignocelulósica (adaptado de Elgharbawy *et al.*, 2016)

Pretratamiento	Categoría	Ventajas	Desventajas
Molienda	Físico	Económico	Gran gasto de energía, incapacidad de remover la lignina.
Explosión de vapor	Fisicoquímico	Ruptura eficiente de las fibras en la biomasa. Económico.	Degradación excesiva de las propiedades físicas y químicas de la celulosa, formación de compuestos inhibidores.

Autohidrólisis	Fisicoquímico	Alto porcentaje de recuperación de sólidos y baja formación de compuestos inhibidores.	Requerimiento alto de energía, remueve principalmente hemicelulosa.
Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	Fisicoquímico	Reduce la fracción de lignina, tiempo de retención corto, no hay formación de productos inhibidores.	Costoso, no solubiliza hemicelulosa de forma significativa, el amoníaco debe ser recuperado para reducir costos.
Hidrólisis ácida	Químico	Bajo tiempo de retención, remueve hemicelulosa y lignina.	Proceso corrosivo y peligroso, requiere equipos especiales, formación de inhibidores.
Hidrólisis alcalina	Químico	Remueve lignina y parte de la hemicelulosa, reduce el grado de polimerización de la celulosa.	Baja digestibilidad de maderas suaves, requiere grandes cantidades de agua para lavado.
Tratamiento microbiológico	Biológico	Degradación de lignina, bajo requerimiento energético.	Requiere altos tiempos de reacción.

Una vez pretratado, el BA es procesado por hidrólisis enzimática para solubilizar la materia orgánica y sacarificar los carbohidratos, ambos procesos realizados de manera eficiente aumentan la biodisponibilidad de los azúcares y materia orgánica para su consumo por los microorganismos y, en consecuencia, reduce el tiempo de los procesos de producción de biocombustibles.

Biocombustibles

Diversos esfuerzos científicos y tecnológicos se han enfocado en esta tarea de producción de diferentes biocombustibles como bioetanol, biohidrógeno y biogás (Tabla 3) a partir del BA. En la siguiente sección se muestra el panorama general y la relevancia en la transición energética del hidrógeno y biogás; en particular, en su obtención por medio de los procesos de fermentación oscura y digestión anaerobia.

Tabla 3. Tipos de biocombustibles obtenidos a partir de bagazo de agave

Proceso	Pretratamiento	Sistema	Biocombustible	Referencia
Fermentación alcohólica	Alta presión con $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ + hidrólisis enzimática	Lote	Etanol	Aguirre-Fierro <i>et al.</i> (2020)

Valorización de bagazo de agave mediante la creación de biorrefinerías

	Líquidos iónicos, organosolv + hidrólisis enzimática	Lote	Etanol	Pérez-Pimienta <i>et al.</i> (2017)
	Autohidrólisis	Lote	Etanol	Ríos-González <i>et al.</i> (2017)
	Líquidos iónicos apróticos + hidrólisis enzimática	Lote	Etanol	Pérez Pimienta <i>et al.</i> (2022)
Fermentación oscura	Hidrólisis ácida	Lote secuencial	Hidrógeno	Muñoz -Páez <i>et al.</i> (2020)
	Hidrólisis enzimática	Filtro percolador	Hidrógeno	Montoya-Rosales <i>et al.</i> (2019)
	Hidrólisis ácida	Lote secuencial	Hidrógeno	Gabriel-Barajas <i>et al.</i> (2022)
	Hidrólisis enzimática	Reactor continuo de tanque agitado	Hidrógeno	Contreras-Dávila <i>et al.</i> (2017)
Digestión anaerobia	Hidrólisis enzimática	Continuo en dos etapas	Biogás	Calderón-Soto <i>et al.</i> (2022)
	Explosión de vapor + hidrólisis enzimática	Lote	Biogás	Estrada Maya y Weber (2022)
	Líquidos iónicos + hidrólisis enzimática	Lote	Biogás	Pérez-Pimienta <i>et al.</i> (2021)

Producción de biohidrógeno

El hidrógeno ha llamado la atención debido a su alto contenido de energía por unidad de peso (142 kJ/g) y su naturaleza libre de carbono, ya que sólo se genera vapor de agua durante la combustión (García-Depraect *et al.*, 2020). El hidrógeno es un vector energético para producir energía calorífica y eléctrica, es usado en celdas de combustible y motores de combustión o mezclado con metano para producir un combustible superior conocido como hythane (término en inglés, se refiere a la mezcla de hidrógeno con metano). La ruta biológica para producir hidrógeno sobresale a la termoquímica y electroquímica, por ser amigable con el medio ambiente y conlleva un menor consumo de energía. En particular, la fermentación oscura (FO) es un proceso biológico, versátil por el uso de diferentes sustratos, con posibilidades de obtener altas tasas de producción de biohidrógeno y que puede ser combinada con el proceso de digestión anaerobia.

En comparación con el metano o bioetanol, los trabajos de producción de biohidrógeno a partir de BA son limitados y están enfocados a la evaluación de pretratamientos, configuraciones de sistemas y condiciones de operación que permiten aumentar el volumen y la tasa de producción de biohidrógeno. Arreola-Vargas *et al.* (2016) compararon hidrolizados ácidos y enzimáticos de BA para producir hidrógeno y metano en una y dos etapas en mesofilia, para cinco proporciones de hidrolizados (20, 40, 60, 80 y 100% v/v). La operación en dos etapas con hidrolizados enzimáticos mostró el mejor desempeño, con rendimientos de 3.4 mol H₂/mol de hexosa y 0.24 L CH₄/g DQO utilizando concentraciones de 40 y 20%, respectivamente. Por su parte, Contreras-Dávila *et al.* (2017) usaron hidrolizados enzimáticos en dos tipos de reactor: tanque con mezclado y filtro percolador, evaluando diferentes cargas orgánicas (17–60 g DQO/L-d). En el tanque con mezclado se alcanzó la máxima tasa volumétrica de producción de hidrógeno de 2.53 L H₂/L-d y rendimiento molar de 1.35 mol H₂/mol con cargas orgánicas de 52.2 y 40.2 g DQO/L-d, respectivamente. Mientras que una carga de 52.9 g DQO/L-d en el filtro percolador alcanzó una producción volumétrica de 3.45 L H₂/L-d y rendimiento molar de 1.53 mol H₂/mol de sustrato.

Estos trabajos han sido de gran importancia en la aportación de conocimiento sobre la producción de hidrógeno a partir de BA; sin embargo, existen desafíos en los sistemas de FO a considerar para mejorar la productividad y el rendimiento de producción de biohidrógeno. Es importante resaltar tres áreas de interés: 1) consumo de hidrógeno endógeno; 2) aprovechamiento del digestato para la extracción de metabolitos; y 3) formación y presencia de compuestos inhibidores como son los polifenoles.

Producción de biogás

La digestión anaerobia (DA) es una tecnología conocida y establecida capaz de tratar y convertir simultáneamente materias primas orgánicas, principalmente en biogás, el cual puede ser usado para producir calor y electricidad. La DA se realiza en cuatro etapas principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, con rutas metabólicas

particulares (Figura 4). La producción de biogás a partir de materiales lignocelulósicos dirige a una estrategia de gran importancia debido al concepto de carbono neutral, con la reducción de más del 90% de la materia orgánica del bagazo, por lo que puede contribuir a la reducción de contaminación asociada (Palomo-Briones *et al.*, 2018).

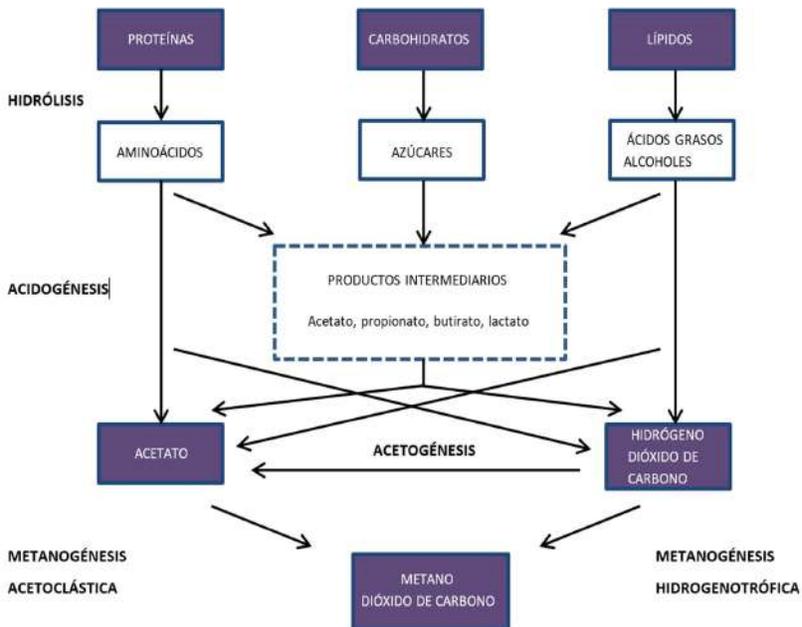


Figura 4. Etapas principales del proceso de digestión anaerobia

El uso de BA para producción de biogás ha sido evaluado por Arreola-Vargas *et al.* (2016) usando hidrolizados enzimáticos, obteniendo rendimientos de 90 mL CH₄/g DQO agregado, con inhibición por la acumulación de ácido acético (3 g/L). Por su parte, Galindo-Hernández *et al.* (2018) pretrataron BA con peróxido de hidrógeno alcalino e hidrólisis enzimática, obteniendo rendimientos de metano de 200 ± 20 mL/g DQO removido, con una degradación de lignina del 97%. Una limitante de la DA es la acidificación del medio provocada por la acumulación de ácidos grasos volátiles en la etapa acidogénica, su control es necesario para evitar la inhibición de

la metanogénesis. Este problema es recurrente en sustratos con alto contenido de carbohidratos ($> 20\text{--}30\text{ g/L}$) como los hidrolizados enzimáticos de BA. Sin embargo, el control en las condiciones como la capacidad de amortiguamiento, la adición de álcali y la velocidad de carga orgánica aplicada pueden resolver este inconveniente. Otra limitante es la baja concentración de nutrientes (p. ej., nitrógeno) en el BA, pues la producción de biogás se ve afectada por la relación carbono/nitrógeno, la cual es recomendable mantener en proporciones de 20:1–30:1.

Limitaciones y perspectivas de la producción de biohidrógeno y biogás

A pesar de los esfuerzos en la investigación que han permitido obtener un conocimiento más amplio sobre los procesos de FO y DA para la producción de biohidrógeno y biogás a partir de BA, aún es necesario mejorar las velocidades y rendimientos de producción, y sobre todo la estabilidad de los procesos a largo plazo. La robustez de los procesos a cambios en condiciones operacionales (e.g., velocidad de carga orgánica), así como el control sobre la inhibición de los procesos por acumulación de subproductos (e.g., ácidos grasos volátiles) son aspectos que deben considerarse para su escalamiento y posterior transferencia tecnológica. Una de las etapas más importantes en la producción de biocombustibles a partir de BA es el pretratamiento tanto por cuestiones económicas como técnicas. Es necesario explorar otra variedad de procesos (autohidrólisis, organosolv, radiación de alta energía, ozonólisis, líquidos alcalinos, iónicos o combinaciones de estos) que pueden ser potencialmente eficaces y rentables. Además, desde el punto de vista práctico, la composición altamente variable de BA constituye otra limitación que perturba los procesos de FO y DA para producir biocombustibles.

Conclusiones

La valorización y uso del BA en un esquema de biorrefinería alineada con los Objetivos de Desarrollo Sostenible son alternativas ante los

problemas de disposición final que este residuo conlleva, ya que se genera en grandes cantidades y su gestión es aún inapropiada. Las biorrefinerías de BA basadas en los procesos de FO y DA permiten el aprovechamiento de este residuo mediante la producción de los biocombustibles renovables como biohidrógeno y biogás. Sin embargo, es importante resaltar que aún existen aspectos importantes por considerar y resolver que permita hacer la creación de biorrefinerías sustentables de BA.

Referencias

- Aguirre-Fierro, A., Ruiz, H. A., Cerqueira, M. A., Ramos-González, R., Rodríguez-Jasso, R. M., Marques, S., & Lukasik, R. M. (2020). Sustainable approach of high-pressure agave bagasse pretreatment for ethanol production. *Renewable Energy*, *155*, 1347–1354. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.055>
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. I., & Méndez-Acosta, H. O. (2016). Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(2), 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J. P., & Welton, T. (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, *15*(3), 550. <https://doi.org/10.1039/c2gc36364j>
- Calderón-Soto, L. F., López-Gutiérrez, I., Valencia-Ojeda, C., Aguilar-López, R., Alatraste-Mondragón, F., & Femat, R. (2022). Two-stage continuous biomethane production from enzymatic hydrolysate of agave bagasse: Modelling, identification and control. *Journal of Process Control*, *120*, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2022.10.007>
- Cámara Nacional de la Industria del Tequilera. (2022). *Informe estadístico 2022*. www.tequileros.org.
- Cedeño, M. A. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, *15*(1), 1-11. <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>

- Contreras-Dávila, C. A., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of *Agave tequilana* bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>
- Consejo Regulador del Tequila. (2022). *Informe Estadístico 2022*. www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb.
- Elgharbawy, A. A., Alam, M. Z., Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2016). Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 252-267. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.021>
- Estrada Maya, A., & Weber, B. (2022). Biogás y bioetanol a partir de bagazo de agave sometido a explosión de vapor e hidrólisis enzimática. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 23(2), 1–10. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2022.23.2.009>
- Gabriel-Barajas, J. E., Arreola-Vargas, J., Toledo-Cervantes, A., Méndez-Acosta, H. O., Rivera-González, J. C., & Snell-Castro, R. (2022). Prokaryotic population dynamics and interactions in an AnSBBR using tequila vinasses as substrate in co-digestion with acid hydrolysates of *Agave tequilana* var. azul bagasse for hydrogen production. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 413–428. <https://doi.org/10.1111/jam.15196>
- Gallardo-Valdez, J. G., Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., Paniagua-Buelnas, N. A., Urzua-Esteva, E., & Montaña-Flores, J. L. (2015). *Ciencia y Tecnología del Tequila: Avances y perspectivas*. CIATEJ. ISBN 978-607-96619-8-4.
- Galindo-Hernández, K. L., Tapia-Rodríguez, A., Alatraste-Mondragón, F., Celis, L. B., Arreola-Vargas, J., & Razo-Flores, E. (2018). Enhancing saccharification of *Agave tequilana* bagasse by oxidative delignification and enzymatic synergism for the production of hydrogen and methane. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(49), 22116–22125. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.071>

- García-Depraect, O., Osuna-Laveaga, D. R., & León-Becerril, E. (2020). A Comprehensive Overview of the Potential of Tequila Industry By-Products for Biohydrogen and Biomethane Production: Current Status and Future Perspectives. En R. Martínez (ed.) *New Advances on Fermentation Processes*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88104>
- Íñiguez, C. G., Lange, E. S., & Rowell, M. R. (2001). Utilization of by Products from the Tequila Industry: Part 1: Agave Bagasse as a Raw Material for Animal Feeding and Fiberboard Production. *Bioresource Technology*, 77(1), 25-32. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00137-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00137-1)
- Íñiguez, G., Martínez, G. A., Flores, P. A., & Virgen, G. (2011). Utilización de subproductos de la industria tequilera: Parte 9. Monitoreo de la evolución del compostaje de dos fuentes distintas de bagazo de agave para la obtención de un sustrato para jitomate. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(1), 47-59. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000100005&lng=es&tlng=es.
- Íñiguez, C. G., Bernal, C. J. J., Ramírez, M. W., & Villalvazo, N. J. (2014). Recycling Agave Bagasse of the Tequila Industry. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 4(2), 135–142. <https://doi.org/10.4236/aces.2014.42016>
- López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., & Gallardo-Valdez, J. (2010). Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9(2), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9204-9>
- Montoya-Rosales, J. de J., Olmos-Hernández, D. K., Palomo-Briones, R., Montiel-Corona, V., Mari, A. G., & Razo-Flores, E. (2019). Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. *Bioresource Technology*, 283, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.072>
- Muñoz-Paez, K. M., Alvarado-Michi, E. L., Moreno-Andrade, I., Buitron, G., & Valdez-Vazquez, I. (2020). Comparison of sus-

- pended and granular cell anaerobic bioreactors for hydrogen production from acid agave bagasse hydrolysates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(1), 275-285. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.232>.
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K. L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J. A., Cortés-Carmona, M. Á., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2018). Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7), 1423–1441. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1421-2>
- Pérez Pimienta, J. A., Papa, G., Sun, J., Stavila, V., Sanchez, A., Gladden, J. M., & Simmons, B. A. (2022). One-pot ethanol production under optimized pretreatment conditions using agave bagasse at high solids loading with low-cost biocompatible protic ionic liquid. *Green Chemistry*, 24(1), 207–217. <https://doi.org/10.1039/d1gc03774a>
- Pérez-Pimienta, J. A., García-López, R. M., Méndez-Acosta, H. O., González-Álvarez, V., Simmons, B. A., Méndez-Pérez, J. A., & Arreola-Vargas, J. (2021). Ionic liquid-water mixtures enhance pretreatment and anaerobic digestion of agave bagasse. *Industrial Crops and Products*, 171. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113924>
- Pérez-Pimienta, J.A., López-Ortega, M.G. & Sanchez, A. (2017a), Recent developments in Agave performance as a drought-tolerant biofuel feedstock: agronomics, characterization, and biorefining. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11, 732-748. <https://doi.org/10.1002/bbb.1776>
- Pérez-Pimienta, J. A., Vargas-Tah, A., López-Ortega, K. M., Medina-López, Y. N., Mendoza-Pérez, J. A., Avila, S., Singh, S., Simmons, B. A., Loaces, I., & Martínez, A. (2017). Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology*, 225. 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.064>
- Ríos-González, L. J., Morales-Martínez, T. K., Rodríguez-Flores, M. F., Rodríguez-De la Garza, J. A., Castillo-Quiroz, D., Cas-

- tro-Montoya, A. J., & Martínez, A. (2017). Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse. *Bioresource Technology*, 242, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.039>
- Rodríguez, R., Jiménez, J. F., del Real, J. I., Salcedo, E., Zamora, J. F., & Íñiguez, G. (2013). Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 11. Compostaje de bagazo de agave crudo y biosólido provenientes de una planta de tratamiento de vinazas tequileras. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(4), 303-313. ISSN 0188-4999
- Sánchez, A., Sánchez, S., Dueñas, P. (2020). The Role of Sustainability Analysis in the Revalorization of Tequila Residues and Wastes Using Biorefineries. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 701–713. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00756-0>
- Silverman, J. R., Danby, A. M., & Subramaniam, B. (2019). Intensified ozonolysis of lignins in a spray reactor: insights into product yields and lignin structure. *Reaction Chemistry & Engineering*, 4(8), 1421-1430. <https://doi.org/10.1039/C9RE00098D>

4.5 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LOS RESIDUOS LÍQUIDOS AGROINDUSTRIALES DE *Agave fourcroydes* Lem. COMO PREBIÓTICO

Ángeles Sánchez-Contreras¹, Yoselin Ávila-Lizarraga², Marisela González-Ávila³ y Tania González-Flores^{1†}

RESUMEN

Los residuos líquidos generados durante el proceso de desfibrado de la penca de henequén (RAL) se extrajeron y liofilizaron obteniendo una fracción a la que se le determinó su contenido de fibra soluble. A la fracción compuesta principalmente de fructanos de cadena corta y saponinas se le realizaron pruebas para garantizar la inocuidad y resistencia a las condiciones fisiológicas del organismo. Se caracterizaron por resistir la degradación por el efecto de los cambios de pH y el efecto de las enzimas digestivas durante la simulación *in vitro*, detectando efecto de hemólisis debido a la presencia de saponinas en soluciones de la fracción de RAL a concentraciones > 5 g/L.

PALABRAS CLAVE: Prebiótico; henequén; residuos desfibrados.

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Subsele Sureste, Parque Científico Tecnológico de Yucatán, Km 5.5 Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Mérida, México, 97302. *tgonzalez@ciatej.mx

² Universidad Anáhuac-Mérida, Escuela de Biotecnología, Km 15.5, Carretera Mérida-Progreso, Int. Km 2 Carretera a Chablekal, México, 97310.

³ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Av. Normalistas 800 Colinas de la Normal, Guadalajara, México, 44270.

Introducción

El uso eficiente de los subproductos procedentes de las actividades agrícolas ha sido un tema de interés para investigadores y productores en los últimos años. La búsqueda de compuestos bioactivos que generen valor agregado a los cultivos y promuevan opciones para mejorar la cadena de producción y la sustentabilidad económica de las empresas ha llevado a explorar nuevas alternativas en el uso de los residuos, actualmente sin importancia comercial actual.

El género *Agave* (*sensu stricto*) es endémico de América, 159 de 210 especies están en México (75%) y 129 son endémicas (García Mendoza *et al.*, 2019). Algunas especies destacan por sus usos industriales y alimenticios, por ejemplo, en Yucatán se cultiva y procesa artesanalmente el henequén (*Agave fourcroydes*) para producir cordeles y fibras naturales (Villegas-Silva *et al.*, 2014). El proceso de obtención de estas fibras es conocido como desfibrado o raspa y genera toneladas de residuos agroindustriales sólidos (RAS) y líquidos (RAL) sin aparente utilidad comercial, aun cuando se determinó que los residuos líquidos contienen 4.47 ± 0.63 % de fibra soluble y pueden ser una fuente potencial de prebióticos (Ávila-Lizarraga *et al.*, 2017). Se ha comprobado que los fructanos presentes en otras especies de *Agave* ejercen un efecto prebiótico que depende, entre otras cosas, de su grado de polimerización (Peshev & Van den Ende, 2014).

La cantidad de fructanos reportados en el henequén cultivado en Yucatán es de aproximadamente 500 mg/g de materia seca (López *et al.*, 2014), mientras que las hojas apicales de *A. fourcroydes* cultivadas en Cuba tienen 19.34 ± 0.25 mg/g y 21.74 ± 0.15 mg/g en las hojas intermedias (García-Curbelo *et al.*, 2009). Otros estudios han reportado que los fructanos de *A. fourcroydes* tienen bajo grado de polimerización con estructuras poco ramificadas y presencia de neofructanos, inulinas e inulo-n-ose series (García-Curbelo *et al.*, 2015; Mancilla-Margalli & López, 2006).

La principal función de los prebióticos es el mantenimiento de la microbiota intestinal, lo que ha llevado a que sus usos sean perfilados para aplicaciones farmacéuticas en humanos e incluso en animales. Uno

de los criterios utilizados para clasificar un compuesto como prebiótico es que debe ser resistente al pH ácido del estómago, no puede ser hidrolizado por las enzimas de los mamíferos y tampoco debe ser absorbido en el tracto gastrointestinal superior (Davani-Davari *et al.*, 2019).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la seguridad y resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal de los residuos agroindustriales líquidos del procesamiento de *A. fourcroydes*.

Materiales y métodos

Material biológico

Los residuos agroindustriales de *Agave fourcroydes* se colectaron en una desfibradora localizada en Holactún, Yucatán (20°52'32"N 89°19'45"O). Los residuos agroindustriales líquidos (RAL) fueron centrifugados a 4,700 rpm y 10°C por 20 minutos. El sobrenadante fue liofilizado a 0.200 mbar y -50°C y conservado en un desecador hasta su utilización.

Caracterización fisicoquímica de los residuos líquidos liofilizados

Para el análisis de color se utilizó un colorímetro marca Hunter Lab, modelo: Mini Scan EZ, midiendo los parámetros L* (negro/blanco), a* (verde/rojo), b* (azul/amarillo), C* (croma o saturación) y H° (hue, tono) (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). La actividad de agua (Aw) se determinó utilizando un equipo de luz infrarroja (analizador portátil LabSwift Novasina) y el pH de las muestras se midió con diluciones 1:2 P/V; las lecturas se realizaron con un potenciómetro previamente calibrado. Todos los análisis anteriores fueron realizados por triplicado.

Para la determinación de la humedad, proteínas y fibra cruda se emplearon las siguientes normas de aplicación en alimentos: NMX-F-428-1982. Determinación de humedad - método rápido de la termobalanza, NMX-F-608-NORMEX-2011. Determinación de proteínas y NMX-F-613-NORMEX-2003. Determinación de fibra cruda.

Los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método DNS (ácido dinitrosalicílico) (Miller, 1959), utilizando fructosa (1 g/L) como estándar. Los azúcares totales se cuantificaron con el método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

Cuantificación de saponinas

La cantidad de saponinas fue medida mezclando 0.1 mL de la muestra (20g/L) con 0.1 mL de solución de vainillina (8% en etanol), se agregó 1 mL de H₂SO₄ 72% a la mezcla y se homogeneizó en vórtex, después se dejó en reposo por 5 minutos en un baño de hielo y posteriormente se incubó a 60°C en un baño de agua durante 15 minutos. La absorbancia de la muestra fue leída inmediatamente a 544 nm (Lee *et al.*, 2011). La curva de calibración se realizó usando saponina de corteza de quillaja (SIGMA) como estándar.

Ensayo de hemólisis

Sobre placas de agar sangre se colocaron seis concentraciones de residuo agroindustrial líquido liofilizado de *A. fourcroydes* (20 g/L, 10 g/L, 5 g/L, 2.5 g/L, 1.125 g/L y 0.56 g/L). La saponina de corteza de quillaja (SIGMA) se utilizó como control positivo (20 g/L) y una solución fisiológica estéril (0.9% NaCl) se empleó como control negativo. Todas las diluciones de la muestra fueron realizadas con solución salina y fueron esterilizadas con un filtro MILLEX GV de 0.22µm (Merk, Millipore). La incubación se realizó a 37°C y los halos de hemólisis fueron monitoreados en cuatro ocasiones desde los 0 a los 120 minutos en lapsos de 30 minutos y a las 24 horas de incubación. El ensayo fue realizado por duplicado (Mex-Alvarez *et al.*, 2020).

Prueba de digestibilidad *in vitro*

Se evaluó *in vitro* la resistencia de los RAL de *A. fourcroydes* al 1% en solución salina en los escenarios correspondientes al estómago e intestino delgado. Las condiciones experimentales se programaron

con base a la fisiología humana normal, a temperatura constante de 37 °C y agitación continua de 120 rpm. El volumen de residencia fue de 200 mL en estómago y 300 mL en intestino delgado con tiempos de residencia de 2 y 3 horas, respectivamente. El control automático del pH (estómago 2.0 – 2.5 e intestino delgado 5.0 -5.5) se realizó utilizando NaOH 3 M y HCl 0.5 M. En estómago se utilizaron 0.33g de pepsina (HYCEL), por su parte, en intestino delgado se adicionaron 0.19 g de pancreatina (CREON), 0.001g de lipasa pancreática (SIGMA) y 1 g de sales biliares (DIFCO). Las muestras se tomaron a las 0, 2 y 5 horas; todas se analizaron en HPLC con un cromatógrafo de líquidos ProStar (ProStar 230) de inyección automática (10µL) con detector de índice de refracción y una columna Aminex HPX-87C (250 x 40 mm) mantenida a 70 °C. Se utilizó C₂H₃N al 5% como fase móvil, con flujo de 0.2 mL / min. Los datos se obtuvieron utilizando el software Empower™ 3 (Ramírez-Rodrigues *et al.*, 2022).

Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica y proximal de los residuos líquidos

Para caracterizar el polvo resultante de la liofilización de los RAL se realizaron determinaciones fisicoquímicas, los resultados se resumen en la Tabla 1. La fracción RAL tenía una humedad inicial de 97.83 ± 0.02 %. Después de la liofilización, el polvo obtenido presentó un color amarillo con tonalidades verdosas (IC* -2.0 y un pH cercano a la neutralidad), reduciendo su humedad a 7.5 ± 0.14% y aunque tuvo un bajo contenido de humedad, su actividad acuosa es relativamente alta, lo que podría favorecer el crecimiento de microorganismos. Los azúcares reductores expresados como fructosa representaron un 21.12% del total de azúcares presentes en la muestra.

Tabla 1. Características fisicoquímicas y proximales de los extractos liofilizados obtenidos de residuos agroindustriales líquidos (RAL)

Parámetro	Valor
L*	67.22 ± 0.32
a*	- 5.21 ± 0.02

b*	37.17 ± 0.26
C*	37.53 ± 0.26
h	-0.13 ± 0.00
Aw	0.84 ± 0.02
% de humedad	7.5 ± 0.14
% de sólidos	92.5 ± 0.14
Fibra cruda (%)	0.61 ± 0.01
Proteína (%)	1.02 ± 0.00
Azúcares totales (%)	17.09 ± 0.13
Azúcares reductores (%)	3.61 ± 0.05
pH	6.4 ± 0.02

Los valores son promedio (n = 3)

Cuantificación de saponinas

Se analizaron las cantidades de saponinas contenidas en los RAL liofilizados, pues es sabido que abundan en las plantas del género *Agave* y presentan efectos antibacterianos y hemolíticos.

Se cuantificaron 15.97 ± 1.21 g de saponinas/L de fracción liofilizada. Esta concentración es alta, en relación al contenido de apenas 0.14 % en peso seco, reportado por Blunden & Jewers (1978) en las hojas de *A. fourcroydes*. Esto se puede explicar ya que, durante el proceso de desfibrado, se realiza la trituración de las hojas en los engranes del trapiche, con agua que arrastra las moléculas hidrosolubles presentes en las hojas, de este modo se explica que las saponinas se concentren naturalmente en el lixiviado (Sidana *et al.*, 2016).

Ensayo de hemólisis

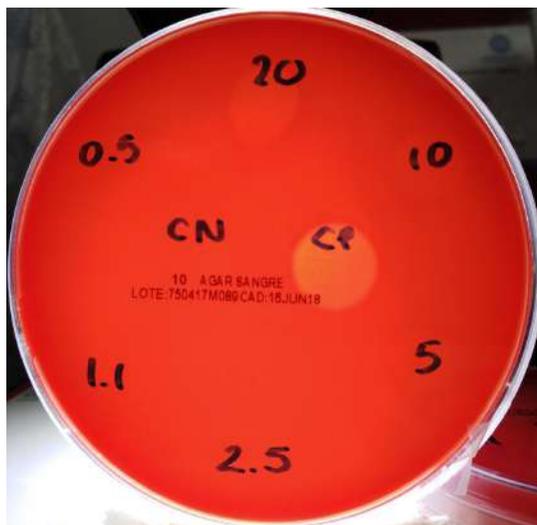
El extracto del RAL liofilizado no mostró hemólisis a concentraciones de 2.25, 1.1 y 0.5 g/L. A concentraciones superiores los halos ya fueron visibles. En la Tabla 2 se resumen los valores promedio obtenidos en los diferentes tiempos y concentraciones evaluadas. En la Figura 1 se muestra el efecto del estándar de saponina, en comparación con las concentraciones a las que fue probada la fracción de RAL liofilizado de *A. fourcroydes*.

Tabla 2. Halo de hemólisis producido por la fracción RAL liofilizada de *Agave fourcroydes*

Tiempo de exposición (min)	Estándar de saponina de corteza de quillaja 20 g/L Halo (mm)	RAL (g/L)		
		5	10	20
30	14.57 ± 0.18	0 ± 0.000	10.25 ± 0.00	11.8 ± 0.28
60	14.57 ± 0.11	10.6 ± 0.35	10.3 ± 0.071	11.87 ± 0.32
90	15.67 ± 0.32	10.12 ± 0.53	10.2 ± 0.99	11.72 ± 1.03
120	15.67 ± 0.32	10.27 ± 0.67	10.6 ± 0.42	11.57 ± 0.11

Los valores son promedio (n = 3).

El análisis de varianza estableció que la interacción entre la concentración y el tiempo utilizado es determinante para la hemólisis ($p < 0.0000$).



Fotografía 1. Ensayo de hemólisis sobre agar sangre. CN= Control Negativo; CP = saponina de corteza de Quillaja; 20= RAL 20 g/L, 10= RAL 10 g/L, 5= RAL 5 g/L, 2.5= RAL 2.5 g/L, 1.1= RAL 1.1 g/L, 0.5= RAL 0.5 g/L. Fuente: Ávila-Lizarraga, Y.

Por otra parte, a mayor concentración de residuo agroindustrial se produce un mayor diámetro en el halo de hidrólisis, siendo cada concentración diferente estadísticamente de la otra ($p < 0.0000$). Cabe destacar que ninguna de las concentraciones evaluadas produjo hidrólisis igual o mayor al control positivo (saponina de corteza de quillaja). En el tiempo también se encontraron diferencias. A la concentración de 5 g/L no se observa hidrólisis durante los primeros 30 minutos, siendo visible el efecto hasta una hora posterior a la aplicación de la solución. La prueba de rangos múltiples para el factor tiempo indicó que el tiempo inicial y final son diferentes entre ellos; no obstante, los tiempos intermedios no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí mismos.

Aunque las saponinas han sido consideradas tradicionalmente como factores antinutrimientales, se han estudiado ampliamente en los últimos años debido a sus actividades biológicas como inmuno-estimuladores, anti-inflamatorias, antibacterianas, entre otras (Navarro del Hierro *et al.*, 2020; Pathaw *et al.*, 2022). También se ha indicado que, desde el punto de vista nutricional, la actividad hemolítica no parece causar efectos adversos, ya que las saponinas no atraviesan la superficie de la mucosa del tracto gastrointestinal que está revestida de células epiteliales que establecen la barrera intestinal efectiva evitando penetrar al torrente sanguíneo (Kim *et al.*, 2015). Por otro lado, se cuenta con estudios que sugieren el efecto tipo prebiótico de las saponinas esteroidales (como las encontradas en las Agaváceas) beneficiando la proliferación de las bacterias intestinales benéficas (Navarro del Hierro *et al.*, 2020).

Prueba de digestibilidad *in vitro*

Los resultados de la prueba de digestibilidad *in vitro* demostraron que la cantidad de FOS contenidos en los residuos agroindustriales de *A. fourcroydes* no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.1251$) durante la prueba (Tabla 3), es decir, resistieron bien las condiciones (simuladas) del tracto gastrointestinal superior. Se sabe que los fructanos no se digieren en el estómago, pero al llegar al

colon, algunas bacterias pueden hidrolizarlos (Peshev & Van den Ende, 2014). Algunos prebióticos de cadena larga (como los fructanos tipo levanos) sufren pequeñas fragmentaciones que ocurren por el ácido gástrico; no obstante, este efecto contribuye a mejorar su disponibilidad para las bacterias benéficas del colon (Arrizon *et al.*, 2014). En la Tabla 3 se muestran los resultados de la evaluación de digestibilidad, corroborando que permanecen intactos hasta las condiciones simuladas del intestino delgado.

Tabla 3. Resultados de la prueba de digestibilidad de los FOS contenidos en la fracción RAL liofilizada de *Agave fourcroydes*

Antes de la digestión (g/L)	Estómago (g/L)	Intestino delgado (g/L)
1.904 + 0.050 ^a	1.905 + 0.133 ^a	1.807 + 0.049 ^a

Los valores son promedio de datos (n = 2). Letras diferentes en la misma fila indican una diferencia estadísticamente significativa según procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) con un nivel del 95.0% de confianza.

Conclusiones

Los residuos líquidos del procesamiento agroindustrial de *A. fourcroydes* tienen gran potencial para ser utilizados como ingredientes funcionales ya que fueron capaces de resistir la degradación por cambios de pH y los efectos de las enzimas digestivas durante la simulación *in vitro* de la digestión hasta el intestino delgado. Se detectó hemólisis debido a la presencia de saponinas en soluciones de la fracción RAL liofilizada a una concentración mayor a 5 g/L. Sin embargo, de acuerdo con lo reportado en literatura, algunas saponinas podrían tener un efecto tipo prebiótico sobre la microbiota intestinal, por lo que resultará interesante caracterizar este extracto para definir su completa inocuidad.

Referencias

- Arrizón, J., Hernández-Moedano, A., Toskoy Oner, E., & González-Ávila, M. (2014). *In vitro* prebiotic activity of fructans with different fructosyl linkage for symbiotics elaboration. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9(3), 69–76.
- Ávila-Lizarraga, Y. G., Sánchez-Contreras, A., González-Ávila, M., & González-Flores, T. (2017). Extracción acuosa de fibra soluble a partir de la biomasa de un subproducto agroindustrial de *Agave fourcroydes*. En J. Zavala, J. Villafaña & F. Espinoza (eds.), *Capítulos temáticos de Biología, Química y Agronomía* (pp. 247-253). Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Blunden, G., Yi, Y., & Jewers, K. (1978). Steroidal sapogenins from leaves of agave species. *Phytochemistry*, 17, 1923–1925. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88734-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88734-8)
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60111a017>
- García Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana*, 126, e1461. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- García-Curbelo, Y., López, M. G., & Bocourt, R. (2009). Fructans in *Agave fourcroydes*, potentialities for its utilization in animal feeding. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 43(2), 169–171.
- García-Curbelo, Y., López, M. G., Bocourt, R., Collado, E., & Albelo, N. (2015). Structural characterization of fructans from *Agave fourcroydes* (Lem.) with potential as prebiotic. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(1), 75–80.

- Kim, J. D., Khan, M. I., Shin, J. H., Lee, M. G., Seo, H. J., Shin, T. S., & Kim, M. Y. (2015). HPLC fractionation and pharmacological assessment of green tea seed saponins for antimicrobial, anti-angiogenic and hemolytic activities. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(6), 1035–1043. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0538-6>
- Lee, J. H., Jeon, J. K., Kim, S. G., Kim, S. H., Chun, T., & Imm, J. Y. (2011). Comparative analyses of total phenols, flavonoids, saponins and antioxidant activity in yellow soy beans and mung beans. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2513–2519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02775.x>
- López, M. G., Huazano-García, A., García-Pérez, M. C., & García-Vieyra, M. I. (2014). Agave fiber structure complexity and its impact on health. En N. Benkeblia (ed.), *Polysaccharides: Natural fiber in food and nutrition* (pp. 45–74). CRC Press.
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832–7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42(2), 57–66. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>
- Mex-Álvarez, R. M. J., Maldonado-Velázquez, M. G., Yanez-Nava, D., Guillén-Morales, M. M., & Cardos-Burgos, E. G. (2020). Actividad hemolítica de *Euphorbiaceae*. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina. Memorias, Ed. Especial*, 1, 54.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Navarro del Hierro, J., Cueva, C., Tamargo, A., Núñez-Gómez, E., Moreno-Arribas, M. V., Reglero, G., & Martín, D. (2020). *In Vitro* colonic fermentation of saponin-rich extracts from quinoa, lentil, and fenugreek. Effect on saponin yield and human gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 106–116. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05659>
- Pathaw, N., Devi, K. S., Sapam, R., Sanasam, J., Monteshori, S., Phurailatpam, S., Devi, H. C., Chanu, W. T., Wangkhem, B., & Man-

- gang, N. L. (2022). A comparative review on the anti-nutritional factors of herbal tea concoctions and their reduction strategies. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.988964>
- Peshev, D., & Van den Ende, W. (2014). Fructans: Prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods*, 8, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.005>
- Ramírez-Rodríguez, M. M., Metri-Ojeda, J. C., González-Ávila, M., Ruiz-Álvarez, B. E., & Baigts-Allende, D. K. (2022). Digestibility and bioaccessibility of leaf protein concentrates and their impact on children gut microbiota. *Waste and Biomass Valorization*, 13(1), 299–314. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01521-y>
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22–46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.010>
- Villegas-Silva, P. A., Toledano-Thompson, T., Canto-Canché, B. B., Larqué-Saavedra, A., & Barahona-Pérez, L. F. (2014). Hydrolysis of *Agave fourcroydes* Lemaire (henequen) leaf juice and fermentation with *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production. *BMC Biotechnology*, 14(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-14>

4.6 CAPACIDAD ESPUMANTE DE EXTRACTOS DEL GUISHE DE *Agave lechuguilla*

Lorena Vargas Rodríguez^{1*}

RESUMEN

El *A. lechuguilla* nativo de zonas áridas y semiáridas es el segundo agave natural más abundante y distribuido en el territorio mexicano, su principal aprovechamiento es la obtención de la fibra o ixtle a través del tallado de sus hojas. El residuo “guishe” (75-85%/peso de la hoja) ha sido mínimamente revalorado industrialmente. No obstante, un grupo de otomíes en Ixmiquilpan, en el estado mexicano de Hidalgo, tienen por rasgo cultural su uso como jabonadura doméstica. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad de espuma en extractos del guishe acuoso y etanólico en presencia de aditivos de la industria de alimentos (sal, azúcar y ácido-álcali). La determinación de saponinas (responsables de formación de espuma) se realizó con el método de espuma y el espectrofotométrico a 528 nm, y como estándar saponina comercial. El rendimiento de saponinas con el método de espuma en la extracción acuosa fue de 22.24 mg/g; en analogía para la etanólica, 32.03 mg/g. Referente a los aditivos alimentarios como efectores en la formación de espuma, la sal cloruro de sodio resultó el máximo reductor en ambos extractos, acentuándose en el etanólico con un 53.42% para la mayor concentración (10% p/v); en tanto, el azúcar sacarosa su efecto fue también de reducción, pero en 20.61%. Por último, el efecto reductor del pH ácido o alcalino en la formación de espuma fue insignificante en los extractos, pero con ligero amortiguamiento a pH neutro.

PALABRAS CLAVE: Saponinas, *Agave lechuguilla*, guishe.

¹ Universidad de Guanajuato. Depto. Ing. Agroindustrial. División de C. de la Salud e Ingenierías. Campus Celaya-Salvatierra, Priv. de Arteaga s/n, centro Salvatierra, Gto., México CP 38900. *lvargas@ugto.mx

Introducción

El *Agave lechuguilla* se extiende en los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas, algunas poblaciones naturales se localizan, específicamente, en los estados de Hidalgo, Oaxaca y México (Marroquín *et al.*, 1981 citado por Castillo *et al.*, 2005). Es un recurso forestal no maderable cultural y económicamente importante para los habitantes de aquellas zonas. En Ixmiquilpan, Hgo., un grupo de otomíes dedicado al tallado (manual en el campo y hogar o mecánico en taller) de las hojas de lechuguilla para la obtención y comercialización de la fibra (conocida como ixtle) tienen por rasgo cultural de usos y costumbres la utilización del guishe (bagazo residual) en una jabonadura doméstica, toda vez que ha sido remojado en agua.

A pesar de la gran cantidad del material guishe que se genera (75-85% del peso de la hoja) en todo México con el desfibrado del agave, existe el mínimo aprovechamiento con un valor agregado industrial. Adicionalmente, en una argumentación ampliada, debieran sumarse también los residuos generales de agaves generados en la producción de bebidas alcohólicas como el tequila, bacanora, mezcal, etcétera (con más del 50 % del peso de la planta). Al menos esta revaloración también la comparte López *et al.* (2017) en su comentario de que: “esos subproductos de agave (desechos de la industria de las bebidas) no se han evaluado ampliamente en los sistemas alimentarios y las áreas farmacéuticas, y esos campos representan una ruta potencial para mejorar el uso”. No obstante, constituyen una fuente potencial de extractos de *Agave* ricos en compuestos bioactivos como saponinas, compuestos fenólicos y terpenos, y que poseen diferentes efectos biológicos, por ejemplo, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, actividad antiinflamatoria, antihipertensiva, inmunomoduladora, anti-parasitaria y anticancerígena (demostrado en pruebas *in vitro* e *in vivo*).

El guishe contiene sustancias jabonosas conocidas como saponinas, estas son metabolitos secundarios cuyas moléculas anfifílicas están conformadas por dos fracciones: la glucosídica y la aglicona o “saponogénica”, esta última puede ser terpeno o esteroide. Las saponinas

esteroidales son típicas de las plantas monocotiledóneas (como los agaves) y en la sección glucósida figuran arabinosa, glucosa, ramnosa, xilosa y galactosa (Góral & Wojciechowski, 2020). Es del dominio general que las saponinas han sido demostradas y documentadas en poseer diversas actividades biológicas, entre ellas implicaciones en mecanismos de defensa ante patógenos, capacidad hemolítica (lisar eritrocitos ricos y alterar membranas celulares), como tensoactivos o surfactantes (reductores de la tensión superficial), etc. y la muy notoria de producir espuma. Algunas saponinas esteroidales han sido utilizadas como precursores en la síntesis de hormonas sexuales que conllevan implicaciones en el crecimiento, peso y fertilidad. Con esas incidencias directas/indirectas (benéficas/riesgosas) es pertinente señalar a las saponinas como sustancias “horméticas”, como lo menciona He (2018), apoyado en la argumentación de Calabrese *et al.* (2007) y Mattson (2008) bajo el término hormesis, que describe una respuesta a dosis bifásica a un factor ambiental (físico, químico o biológico) caracterizado por una estimulación de dosis baja o efecto beneficioso y un efecto inhibitor o tóxico de dosis alta en la célula u organismo.

Lo más reciente y ampliado que se conoce en identificación de las saponinas para *A. lechuguilla* ha sido publicado por Peña *et al.* (2020), identificaron por MS-HPLC en extractos metanólicos del guishe seis saponinas y un flavonol (quercetina), siendo las saponinas: diosgenina, esmilagenina, hecogenina, manogenina, tigogenina hexosa, yucagenina, clorogénica y glucósido diosgenina. Además, los autores ensayaron los extractos de guishe como aditivo alimentario en la dieta de camarones (*Litopenaeus vannamei*) y sus resultados sugieren a cinco semanas de alimentación una mejora de la salud y la nutrición para el tratamiento del 3%, determinando mayor crecimiento respecto a un control. Por último, enfatizar que los estudios de los extractos de guishe de lechuguilla poco han sido enfocados a evaluar su capacidad de espuma con pretensiones de aditivos de la industria alimentaria y de bebidas (frías, calientes, alcohólicas, no alcohólicas y analcohólicas). Por lo que el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad de espuma en extractos de guishe acuoso y etanólico en presencia de aditivos de la industria de alimentos (sal, azúcar y ácido-álcali).

Materiales y métodos

El guishe donado en Ixmiquilpan, Hidalgo, por talladores de hoja de *Agave lechuguilla* para la obtención del ixtle fue una muestra representativa del residuo acumulado en pisos de talleres, cuyo aspecto de hierba seca triturada y fibra residual es presentado en la Figura 1.



Figura 1. Guishe de *A. lechuguilla* recolectado de talleres del tallado de hojas para la obtención de fibra ixtle. Fuente: elaboración propia

Extracción de saponinas del guishe

La metodología utilizada en este trabajo aparece esquematizada en la Figura 2.

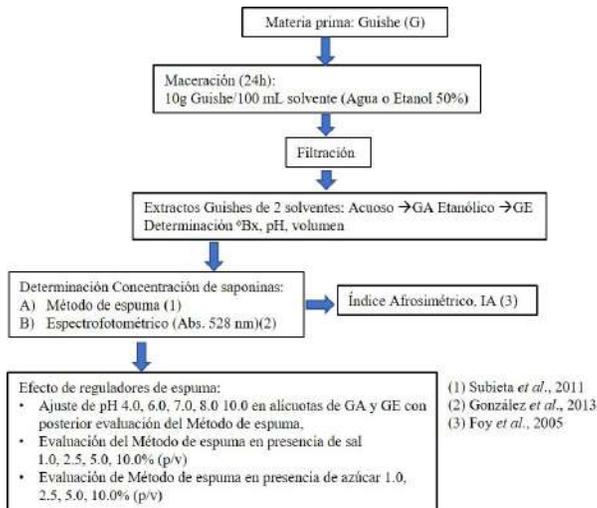


Figura 2. Esquema de metodología experimental. Fuente: elaboración propia

Las saponinas fueron extraídas una vez por maceración del guishe (G), previamente tamizado (malla 6-8), utilizando agua desionizada (GA) y alcohol etílico al 50 % (GE), en proporción de 10 g de G por 100 mL de solvente durante 24 h a temperatura ambiente. El contenido fue mezclado para homogeneización con una espátula evitando espumar. La maceración ocurrió en vasos de precipitados de 500 mL tapados con plástico autoadherible y en oscuridad, luego se filtró sobre papel filtro de uso doméstico, obteniéndose GA y GE del día 0 (d0).

Pruebas de análisis cuantitativo y cualitativo para saponinas y monitoreos

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. A los extractos GA y GE se les determinaron volumen, pH y grados brix (°Bx). En este mismo día (d0) se ensayó la capacidad de espuma (Subieta *et al.*, 2011) como método indirecto para determinar concentración de saponinas y que consiste en medir la columna de espuma provocada por la solución contenida en tubos de ensayo de 16 mm de diámetro (Ø). El GE fue ensayado para espuma con 0.5 mL, la mitad del GA, pero ajustado a 1 mL con agua (como marca

la técnica), lo anterior para minimizar el efecto reductor de etanol en la formación de espuma. La curva patrón ocurrió con un estándar (Std) grado reactivo de saponina marca Sigma. La determinación de concentración de saponinas en GA y GE a 528nm fue realizada (González *et al.*, 2013) con base en la curva patrón de saponina Std. El almacenamiento y conservación de los extractos hasta el siguiente uso fue en refrigeración utilizando recipientes herméticos no traslúcidos. Monitoreo de pH, °Bx y formación de espuma fueron determinados en GA y GE en los siguientes cuatro días. El índice afrosimétrico IA es el número que expresa el volumen en cm³ en que está disuelto 1 g de material saponínico para producir espuma de 1 cm de altura en un tubo de 16 mm (Ø) que contiene 10 ml de soln. (Foy *et al.*, 2005). Se prepararon soluciones (GA, GE y la saponina std.) al 0.5% para ensayar el método del IA. Las reacciones de identificación de saponinas por color Salkowski, Liebermann-Burchard y Molish (o α -naftol) fueron ensayadas para los extractos de acuerdo con Foy *et al.* (2005).

Efectores en la capacidad de espuma de las saponinas del guishe de agave lechuguilla

Finalmente, se evaluó el efecto del pH, sal NaCl y azúcar sacarosa en la formación de espuma. Respecto del pH, alícuotas de los extractos GA, GE y la saponina Std fueron ajustadas (utilizando NaOH 0.1N o HCl 0.1N) a pH 4.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 10.0, posteriormente se ensayó el método de espuma rutinario. Por otra parte, en tubos de ensayo se pesaron cantidades de sal o azúcar que ajustaran (en volumen final de 1 mL) las concentraciones individuales de 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0% y se continuó con la técnica ordinaria para determinación de espuma.

Resultados y discusión

Extracción de saponinas, métodos de cuantificación e índice afrosimétrico

El extracto de GA al d0 presentó pH 4.5 y se modificó hasta pH 4.2 (d4), en tanto para GE se observó invariable (4.9-4.8). Los re-

sultados de las determinaciones, según la metodología, se presentan en la Tabla 1. De acuerdo con los valores de °Bx (d0) 5.35 ± 0.49 y 14.60 ± 0.70 para GA y GE respectivamente, el solvente etanol al 50% extrajo 1.73 veces más sustancias que el agua desionizada; sin embargo, la técnica no asegura exclusividad de saponinas. La mejor evidencia cualitativa de sustancias jabonosas o saponinas es la formación de espuma. El método de espuma ensayado con saponina Std resolvió la curva patrón [Ec. 1: $mg=(mm-5.39)\div 6.29$, $r^2=0.99$] y con ello se concluyó que el extracto GA presentó una concentración de 3.64 mg/mL, así que el rendimiento es 22.24 mg/g-guishe o 2.22 % de saponinas en el guishe. En analogía, para GE la concentración resultante fue 5.82 mg/mL que conllevan a 32.04 mg/g- guishe o 3.2036% saponinas en guishe. Sharma *et al.* (2023) presentan una tabla con % de saponinas totales para alimentos, pero no figuran agaves; sin embargo, la *Yuca schidigera* es de la familia agavacea y le refieren un valor de 10%. Existe amplitud de valores en el listado, así para hojas de betabel (*Beta vulgaris*) y alfalfa (*Medicago sativa*) reportan 5.8 y 0.14-1.71 % respectivamente.

Tabla 1. Determinaciones de pH, concentración de los extractos de guishe e Índice Afrosimétrico

Determinación	GA (Guishe Acuoso)	GE (Guishe Etanólico)
pH (día 0 → día 4); °Bx (día 0)	4.5-4.2; 5.35 ± 0.49	4.9-4.8; 14.6 ± 0.7
Método de espuma		
$mg=(mm-5.39)\div 6.29$, $r^2=0.9211$	3.64 mg/mL	5.82 mg/mL
• Concentración (saponina/extracto)	22.24mg/g (2.22%, P/P)	32.03 mg/g (3.20%, P/P)
• Rendimiento (saponina/guishe)		
Método espectrofotométrico (528 nm)		
$mg=(Abs-0.0791),r^2=0.9975$	111.82 mg/mL	5.82 mg/mL
	(11.18%, P/P)	32.03 mg/g (32.20%, P/P)
• Rendimiento (saponina/guishe)		
Índice Afrosimétrico IA* (usando 3.34 mg/mL, [$mm=(0.41\ mg+1.1609),r^2=0.9688$]	21.55 mg de saponinas para formar 1 cm de espuma.	Interferencia del etanol en la formación de espuma, hizo inviable la medición.

* Saponina estándar [$mm=0.15\ mg+11.18$, $r^2=0.954$], obtuvo 136.08 mg de IA.

La cuantificación de saponinas, a través de la absorbancia a 528nm, requirió de curva patrón con saponina Std [Ec. 2:

$mg=(Abs-0.0676)\div 0.0791$, $r^2=0.9975$]. El cálculo del rendimiento determinó 111.82 mg/ mL o bien 11.18% de saponinas en GA, en contraparte, los valores para GE fueron 154.48 mg/mL y 15.44%. Estas cifras son más de tres y cuatro veces superiores a las preestablecidas con metodología de formación de espuma (Ec. 1); sin embargo, parece mantenerse una relación de 0.7 entre los rendimientos de las muestras (GA y GE) para una misma metodología, espuma o espectrofotométrica ($2.22/3.2=0.69$ y $11.18/15.44=0.72$). Alcohol etílico 50% mejora la extracción de saponinas, pero también de contaminantes, como lo revelan ambos métodos de cuantificación. Guzmán *et al.* (2013) ensayaron en sus mediciones de saponinas, de igual forma, el método de espuma y el espectrofotométrico a 528 nm para muestras de granos andinos, 15 de cañihua, 1 de quinua y 1 más para quentu, encontraron diferencias en la cuantificación de los métodos, por ejemplo, para las 15 muestras de cañihua 7.5-21.5 mg/ g en espuma frente a 8.7-43.2 mg/g en espectrofotométrico, aunque fueron menos distantes que lo determinado con el guishe. Es interesante saber que quentu con abundancia de saponinas no presentó gravosa diferencia de valores entre los métodos (121.6 mg/g vs 112.5 mg/g). Para el guishe de lechuguilla se recomienda el método de espuma porque no excedió los °Bx determinados para ambos extractos, a diferencia del espectrofotométrico. El IA determinó que para GA la altura de 1 cm de espuma corresponde a un tubo hipotéticamente preparado con 21.5588 mg de saponinas (fundamentado en 3.34 mg / mL como valor más exacto y su propia curva patrón [Ec. 3: $mm=(0.4100mg+1.1609)$, $r^2=0.9688$]. Aunque se sugiere cuidado para la interpretación de 21.55 mg, debido a la variabilidad en la determinación de la concentración según el método. No se realizaron los ensayos para GE por anticipar IAs subestimados a consecuencia del efecto reductor de espuma que provoca el etanol presente. Escasos trabajos reportan IA; sin embargo, Foy *et al.* (2005) determinan un valor de 200 para *Agaricus bisporus*, mencionan que un valor <20 prácticamente no contiene saponinas. El IA puede resultar de utilidad como base analítica para evidenciar la eficiencia de las etapas de purificación o seguimiento de producto saponínico.

Pruebas químicas de identificación de saponinas

Las reacciones de color para identificar saponinas Salkowski, α -Naftol o Molish y Liebermann-Burchard dieron positivo en todos los casos, eso se observa en la Figura 2 izquierda, central y derecha, respectivamente, con dos concentraciones (15 mg: A, B, C; 7.5 mg: A', B', C') de GA (A', A), GE (B', B) y saponina Std o control (+) (C', C), además de un control (-) de agua desionizada (D).

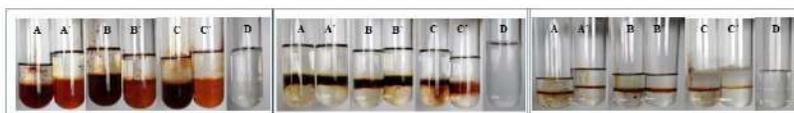


Figura 3. Pruebas cualitativas de color para identificar saponinas. Izq. Salkowski, Centro α -Naftol o Molish, Der. Liebermann-Burchard. Fuente: elaboración propia.

Efectores en la capacidad de espuma de las saponinas del guishe de agave lechuguilla

El efecto de pH en la formación de espuma básicamente fue invariable para el GA en todos los pHs evaluados. El máximo valor de espuma (37.80 mm) ocurrió a pH 7.0 con una diferencia del 20.61% para el menor (pH 4.0), de 30.01 mm, aproximadamente el doble de la desviación estándar (9.89%) de las lecturas triplicadas. Similar situación ocurrió para GE. Lo anterior es un asunto favorable si se desea utilizar las saponinas del guishe de agave para gama de productos de bebidas o alimentos sin que el pH interfiera con la formación de espuma. La evaluación de efecto de sal y azúcar fue realizada a pH original de los extractos. Los resultados son presentados en la Figura 4. La sal NaCl redujo la formación de espuma para GA, GE y saponina Std directamente proporcional a la concentración de 1 a 10 %; sin embargo, GE fue mayormente afectado alcanzando 53.42% de reducción, revelando una posible sinergia del etanol y la sal, esto se presenta en la Figura 4 (barras derechas de concentración 10%).

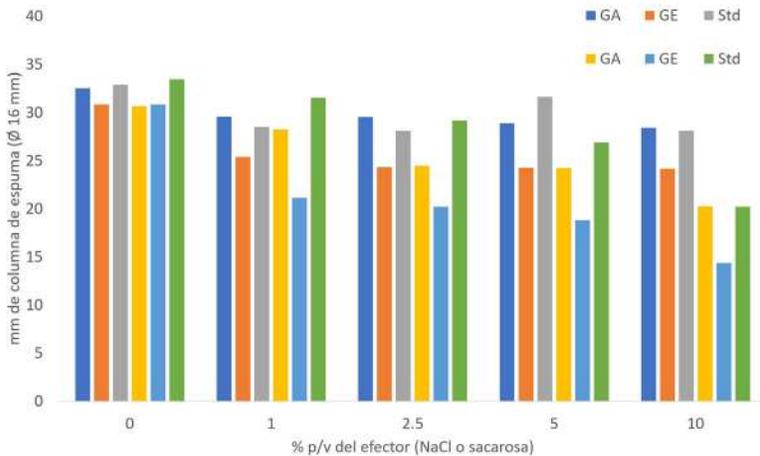


Figura 4. Comparativa de los efectores sal (NaCl) y azúcar de caña (sacarosa) para formación de espuma en Guishe Acuoso (GA), Guishe Etanólico (GE) y estándar (Std). Fuente: elaboración propia.

En contra parte, la sacarosa o azúcar de caña presentó insignificante afectación en la formación de espuma para GA y saponina Std (ver figura 4) (barras izquierdas de concentración), pero nuevamente GE (con etanol presente) fue el de mayor afectación, reduciéndose en 21.71% con sacarosa presente. En la literatura científica no existe documentación similar con estos aditivos (sal y azúcar), ni pH. Sin embargo, se destaca que los extractos de guishe se comportaron similar a la saponina estándar (Std) con los tres efectores.

Conclusiones

Los rendimientos de sustancias espumosas a suponer saponinas en el guishe de lechuguilla y el atractivo valor de índice afrosimétrico (IA) invitan a profundizar en investigaciones para aplicaciones de diversos productos espumosos, por ahora los de la industria de alimentos destacando la repostería, de bebidas desde frapés, cafés, vinos, cervezas, entre otros. Lo anterior con la gestión oportuna de las regulaciones oficiales para el uso en la dosis de ingesta sin riesgo, recordando se

trata de sustancias “horméticas”. Sin embargo, las aplicaciones de saponinas del guishe de *Agave lechuguilla* se consideran fructíferas a muchos campos de las industrias como agricultura, farmacia, cosmética y, por supuesto, alimentaria, tan solo para este único atributo de capacidad de formación de espuma.

Referencias

- Barriada-Bernal, L. G., Aquino-González, L. V., Méndez-Lagunas, L. L., Rodríguez-Ramírez, J., & Sandoval-Torres, S. (2018). Caracterización física y nutricional de frutos de yuca (*Yucca mixteca*). *Agrociencia*, 52(3), 347-359. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000300347&lng=es&tln=es
- Castillo, Q. D., Berlanga, R. C. A., & Cano, P. A. (2005). *Recolección, extracción y uso de la fibra de lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.) en el estado de Coahuila*. (Pub. Esp. Núm. 6) INIFAP-CIRNE
- Foy, V. E., Mac, D. D., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2005). Extracción y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. *Biotempo*, 5, 31-36.
- Gonzales, E., Flores, Y., Almanza, G. R., & Lozano, M. (2013). Effect in acute inflammation of saponin extract and isolated saponins from quinoa waste (*Chenopodium quinoa willd*). *Revista Boliviana de Química*, 30(2), 115-121.
- Góral, I., & Wojciechowski, K. (2020). Surface activity and foaming properties of saponin-rich plants extracts. *Advances in Colloid and Interface Science*, 279, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102145>
- Guzmán, B., L. Cruz, D., Alvarado, J. A., & Mollinedo, P. (2013). Cuantificación de saponinas en muestras de cañihua *Chenopodium pallidicaule* aellen. *Revista Boliviana de Química*, 30(2), 131-136. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602013000200004&lng=es&tln=es.
- He, C. (2018). Implication on hormetic effect in traditional chinese medicine. *Longhua Chinese Medicine*, 1(5), 6. doi: 10.21037/lcm.2018.05.02
- Liao, Y., Li, Z., Zhou, Q., Sheng, M., Qu, Q., Shi, Y., Yang, J., Lv, L., Dai, X., & Shi, X. (2021). Saponin surfactants used in drug

delivery systems: A new application for natural medicine components. *International Journal of Pharmaceutics*, 603, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120709>.

- López-Romero, J. C., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., Peña-Ramos, E. A., & González-Ríos, H. (2018). Biological activities of *Agave* by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2461-2474. doi: 10.1002/jsfa.8738
- Peña-Rodríguez, A., Pelletier-Morreeuw, Z., García-Lujan, J., Rodríguez-Jaramillo, M. C., Guzmán-Villanueva, L., Escobedo-Fregoso, D., Tovar-Ramírez, A. G., & Reyes, A. G. (2020). Evaluation of *Agave lechuguilla* by-product crude extract as a feed additive for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 51, 1336–1345. <https://doi.org/10.1111/are.14497>
- Sharma, K., Kaur, R., Kumar, S., Kumar, R. S., Sharma, S., Pawde, S. V., & Kumar, V. (2023). Saponins: A concise review on food related aspects, applications and health implications. *Food Chemistry Advances*, 2, <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100191>
- Subieta-Chinchilla, C., Quiroga-Ledezma, C., Escalera-Vásquez, R., & Artega-Weill, L. (2011). Recuperación de residuos sólidos con alta concentración de saponinas del proceso de beneficiado en seco de granos de quinua amarga. *Investigación & Desarrollo*, 1(11), 96-112

5-. Aspectos socioculturales del agave: normatividad y patrimonio



5.1 PROYECTO LAM: UNA ALTERNATIVA PARA LA CONSERVACIÓN DE AGAVES REGIONALES DE OAXACA

Matías Domínguez-Laso^{1*} y Graciela C. Angeles Carreño^{1*}

RESUMEN

Proyecto Lorenzo Ángeles Mendoza (PLAM) es un proyecto emanado de una cooperativa familiar que tiene como objetivo el rescate, conservación y propagación de agaves a través de semillas. Aunado a estas acciones, el proyecto también plantea diseñar una metodología para un manejo agroecológico, así como documentar las estrategias biológicas y reproductivas del maguey. De esta manera, proyecto LAM se define como un proyecto local de innovación, generación de conocimiento y educación, a través de modalidades de ciencia ciudadana y escuelas campesinas para estimular la participación de la comunidad en el cuidado del medio ambiente y específicamente de los agaves de su región.

PALABRAS CLAVE: Proyecto LAM, agaves, proyectos locales, conservación de agaves, banco de semillas de agave, rescate de agaves, germoplasma, ciencia ciudadan

¹ Proyecto LAM A.C., Iturbide s/n Santa Catarina Minas, Oaxaca.

*oaxaca@proyeclam.org

Introducción

El género *Agave* es endémico de América, contiene aproximadamente 210 especies, 159 se distribuyen en México (75% del total) y 129 son endémicas del país (81%) (García-Mendoza, 2011; García-Mendoza *et al.*, 2019). En el estado de Oaxaca se conocen entre 54 y 58 especies de agave (Starr, 2021; García-Mendoza, 2004), cifra que representa cuando menos una tercera parte del total nacional y lo coloca como el estado con mayor riqueza y diversidad de agaves.

Dentro de los principales usos de esta planta está la producción de mezcal, bebida que ha ganado fama internacional en los últimos 10 años. Derivado de dicho éxito, se ha generado una dinámica de cultivo y explotación exponencial de la planta, provocando un desequilibrio en la tasa de reemplazo de los agaves mezcaleros, principalmente en el estado de Oaxaca. Pues es aquí donde se produce hoy día más del 85% del mezcal envasado.

Oaxaca entonces, además de ser el estado con mayor volumen de producción de mezcal, también lo es en la extracción de agaves silvestres y poco a poco ha ido cambiando la vegetación nativa por cultivos intensivos de maguey espadín. Paralelamente, el aumento en el número de palenques (fábricas de mezcal) que consumen agua y leña para la producción de la bebida ha generado la preocupación de algunos productores locales quienes, preocupados por el futuro, han creado iniciativas para contrarrestar el efecto antes mencionado.

Un caso particular es la Cooperativa Familiar Mezcal de los Ángeles, proyecto que tiene su origen en el año 1978 y se ubica en el municipio de Santa Catarina Minas. El proyecto integrado hoy día por cuatro hermanos y su madre, son de los pocos proyectos que cuentan con la cadena completa, produciendo desde la semilla hasta la venta de la botella.

Guiado bajo la filosofía de don Lorenzo Ángeles Mendoza, el padre de la familia, quien falleció en 2016 y en honor al cual en 2018 se creó el Proyecto Lorenzo Ángeles Mendoza (PLAM), con el objetivo de rescatar, conservar y propagar agaves mezcaleros de su región a través de semillas.

Siendo Santa Catarina Minas una comunidad productora de mezcal donde el esquema consistía en una organización regional en la que algunos municipios abastecían de la materia prima, Minas compraba los magueyes para procesarlos y toda la región compraba el mezcal, pues el consumo era a ese nivel, únicamente regional.

A inicios de este siglo, todo el esquema de producción se vio afectado por la llegada de capitales que fueron desarticulando los mercados regionales, así como los criterios para la compra del maguey¹. Lo anterior se vio reflejado en la primera crisis de maguey en Oaxaca, la cual no involucraba la escasez o sobreproducción de espadín, sino la escasez del resto de especies empleadas para producir mezcal, ya fuera por la sobreexplotación en el caso de los silvestres o bien porque los intermediarios comenzaron a comprar magueyes jóvenes para abastecer la demanda de los cientos de palenques que han ido poblando gran parte del estado.

Aunado al tema de la sobreexplotación, la instauración del monocultivo del maguey espadín se fue convirtiendo en un foco de atracción de plagas y enfermedades que se cree fueron traídas a estas regiones a partir de la entrada de camiones procedentes de Jalisco para llevarse el maguey comprado en Oaxaca. Es decir, como resultado de una falta de control fitosanitario en la región agavera de Oaxaca.

Considerando los elementos antes mencionados, PLAM se fue encontrando más retos que atender, con miras a proteger el germoplasma de la región bajo una mirada ecológica o libre de pesticidas y agroquímicos, así como un laboratorio *in situ* donde realiza el seguimiento de la vida de estas plantas, así como el monitoreo de su reproducción a través de la fenología de los agaves, documentando los procesos de polinización, floración y reproducción de las distintas especies de la colección. De esta manera su huerto madre es de donde se provee de semillas para reproducir sus propios agaves y de esta manera asegurar su materia prima, al tiempo que se ha convertido en el primer banco de semillas de agave en la Región.

¹ En el pasado, la compra de maguey se hacía por pieza, surco, ciento, docena o camioneta. Actualmente todo el maguey se vende por kilo, criterio introducido por los tequileros que han estado comprando maguey en Oaxaca desde 2005.

Objetivo

Dadas las características del proyecto, el objetivo de proyecto LAM está organizado en 4 objetivos específicos:

1. Ser un proyecto integral de conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de agaves regionales.
2. Compartir con pequeños productores de agave los conocimientos generados a través de la metodología participativa de campesino a campesino.
3. Ser un espacio de innovación y generación de conocimiento o de ciencia ciudadana, para estimular la participación de la ciudadanía en el cuidado de la naturaleza y el medio ambiente.
4. Conformar el primer banco de semillas de agave en la Región de Valles Centrales en el estado de Oaxaca.

Materiales y métodos

Como ya hemos señalado, PLAM cuenta con dos parcelas o huertos madre, ambos ubicados en la comunidad de Santa Catarina Minas. Estos representan el laboratorio vivo, desde el que se documenta *in situ* el proceso de reproducción y propagación de los agaves.

La colección de agaves de PLAM está conformada por un total de 24 especies, de las cuales 13 crecen de manera natural o por cultivo en los municipios de la región donde la comunidad de Santa Catarina Minas históricamente cosechó agaves; mientras que las 11 especies restantes son especies que tienen importancia ecológica y de conservación y se encuentran distribuidas en la misma zona.

Partiendo del objetivo planteado en 2022, que consistió en documentar la fenología floral, el primer paso a seguir fue la revisión bibliográfica para documentar los estudios sobre taxonomía, distribución, fenología y conservación de agaves. A partir de la revisión bibliográfica se pudo establecer la metodología para su documentación, registro, toma de datos y seguimiento.

En el registro realizado sobre la fenología floral se monitorearon 10 agaves que iniciaron su estado reproductivo en el 2021, los cuales se enumeran a continuación: 2 Maguey blanca (*Agave americana*), 2 Maguey sierruda (*Agave americana americana*), 3 Maguey sierrudita (*Agave americana*), 1 Cuishe (*Agave rhodacantha*), 1 Agave tobalá (*Agave potatorum*). Dado que PALM cuenta con un sistema de registro y monitoreo de los agaves del huerto madre, el registro inicia con la aparición del escapo floral. El registro inició con la medición semanal de los quiotes desde su aparición hasta el inicio de la floración, con la finalidad de registrar el desarrollo del escapo floral o quiote, así como la formación y desarrollo de las panículas florales y la duración del periodo de floración (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de especies de agaves que fueron monitoreados durante el año 2021

Nombre común y científico	Periodo de crecimiento de quiote		Periodo de crecimiento de copa		Periodo de floración		Tamaño final de quiote
	Inicio	Término	Inicio	Término	Inicio	Término	
Blanca (<i>Agave americana</i>)	19/02/21	21/05/21	09/04/21	21/05/21	03/06/21	09/07/21	8.68m
Blanca (<i>Agave americana</i>)	08/03/21	21/05/21	30/04/21	21/05/21	27/05/21	26/06/21	7.35m
Sierruda (<i>Agave americana americana</i>)	10/02/21	21/05/21	09/04/21	21/05/21	07/06/21	13/07/21	7.72m
Sierruda (<i>Agave americana var. americana</i>)	12/02/21	18/03/21	Planta dada de baja por infestación de picudo				4.32m
Arroqueño (<i>Agave americana var. oaxacensis</i>)	22/03/21	21/05/21	23/04/21	21/05/21	23/06/21	23/07/21	5.76m
Sierrudita (<i>Agave americana</i>)	01/02/21	21/05/21	01/04/21	21/05/21	02/06/21	12/07/21	7.76m
Sierrudita (<i>Agave americana</i>)	12/02/21	21/05/21	01/04/21	21/05/21	16/06/21	17/07/21	7.32m
Sierrudita (<i>Agave americana</i>)	11/02/21	21/05/21	01/04/21	21/05/21	03/06/21	08/07/21	7.02m
Cuishe (<i>Agave rhodacantha</i>)	02/03/21	21/05/21	19/04/21	21/05/21	09/06/21	23/07/21	5.20m
Tobala (<i>Agave potatorum</i>)	04/05/21	13/08/21	05/07/21	20/08/21	03/08/21	18/08/21	3.18m

Fuente: Registros obtenidos de la base de datos de plantas madre de PLAM 2021.

De manera individual, en cada muestra de flores de la planta madre se observó la **preantesis**, que se refiere al crecimiento de los botones florales maduros cuando pasan de ser vegetativos a reproductivos; así como la **antesis**, que es cuando inicia la apertura floral donde ocu-

re el despliegue de los sépalos, tépalos, estambres y pistilo a través del tiempo que sucede la antesis (periodo que tarda un botón floral desde que abre hasta que es polinizado y se convierte en fruto o en caso contrario es abortado y se cae). Este proceso se documentó por medio de registros fotográficos, con lo que se generó un banco de imágenes de la secuencia del desarrollo floral.

Para poder documentarlo se emplearon dos técnicas fotográficas: 1.- Macrofotografía; la cual amplía el tamaño del objeto a registrar, con la finalidad de observar detalladamente la flor y sus partes, ya que algunas partes no pueden observarse a simple vista. 2.- Fotografía de fluorescencia visible inducida por radiación ultravioleta (UVIVF). La cual tiene como objetivo observar el color mediante el cual los polinizadores nocturnos ven las flores, con lo que podemos identificar una de las estrategias de la planta para poder ser polinizada.

Resultados y discusión

Durante el proceso de floración en 2022, se documentó el proceso de floración de 10 ejemplares de agave localizadas en el huerto madre de PLAM con la finalidad de responder algunas preguntas de las que no se encontró respuesta durante la documentación del tema.

Algunas de las preguntas planteadas fueron: ¿Cuáles son las etapas por las que pasa una flor de agave? ¿Cuántos días mantiene la flor su vitalidad? ¿Cómo se desarrollan sus órganos reproductivos? ¿Cuánto tiempo dura el proceso completo? ¿Cómo pueden identificar los polinizadores la ubicación de los quistes floreciendo?

Para responder estas preguntas, entre los meses de junio y julio de 2022 se realizó la documentación escrita y fotográfica de 10 agaves de las especies *americana*, *rhodacantha* y *potatorum* localizadas en el jardín de plantas madre de PLAM.

Como se sabe, los agaves al llegar a la madurez desarrollan una inflorescencia, conformada por un escapo alto, semileñoso y terminal en forma de espiga donde se ubican las flores (Figura 1). Al ser monocárpicos, la florescencia acontece sólo una vez en su vida, dependiendo de la especie, esto ocurre entre los 5 y los 30 años

(Gentry, 1982; Good-Avila *et al.*, 2006). La forma de la inflorescencia ha sido empleada para separar el género en dos subgéneros: *Littaea* con **forma de espiga** densa (espiciforme) o **racimo** (recemosa), y *Agave* con forma de **panícula**, donde las flores están en agregados umbelados o pedúnculos florales de tamaño regular y de longitud decreciente. El tamaño de las inflorescencias es también tan variable como especies existentes y, generalmente, guardan proporción con respecto a la roseta (Gentry, 1982).

Al iniciar su reproducción sexual, los agaves efectúan una rápida elongación del meristemo apical, desplegando como escapo floral o inflorescencia que sobrepasa la altura del resto de las especies vegetales asociadas a ellas; conforme alcanza su altura máxima, emergen sus flores directamente del escapo donde se puede decir que salen ramas y sobre ellas una panícula de botones florales (Jaques-Hernández & Salazar, 2009).



Figura 1. Crecimiento del quiote (escapo floral) de tres especies de agave A) *A. potatorum*, B) *A. lyobaa* y C) *A. marmorata* que señala el inicio de la etapa reproductiva, ejemplares albergados en PLAM (Fotografía M. Domínguez-Laso)

La mayoría de las especies del género *Agave* son consideradas como surculosas, lo que implica que cuentan con dos mecanismos biológicos de reproducción: sexual y asexual. En la reproducción sexual se realiza un intercambio genético donde el resultado es la formación de semillas. La reproducción por semillas (reproducción sexual) es de gran importancia debido a que garantiza el mantenimiento y generación de la variabilidad genética en las poblaciones, o segregación de las plantas hijas y favorece la colonización de nuevos individuos (Magaña-González *et al.*, 2007; Jacques-Hernández & Salazar, 2009).

El éxito de la fenología floral determinará la capacidad de producción de semillas, así como la capacidad de la germinación y de la sobrevivencia de las plántulas a largo plazo (Angeles-Carreño & Domínguez-Laso, 2022).

En contra parte, la reproducción a través de hijuelos o bulbos aéreos (reproducción asexual) es la forma de reproducción más efectiva para algunas especies (Gentry, 1982). Tras la documentación de la fenología floral se pudo apreciar una serie de cambios morfológicos con la anthesis o apertura floral, mismos cambios que son realizados como una respuesta a estímulos ambientales en la etapa que se denomina inducción a la floración y consiste básicamente en la transformación del ápice caulinar que pasa de vegetativo a reproductivo; es decir, deja de producir hojas para formar flores (Troiani *et al.*, 2017).

Lo anterior permitió determinar que la mayoría de las especies en floración presentes en Proyecto LAM pertenecen al subgénero *Agave*, siendo las especies documentadas Maguey blanca (*Agave americana*) Maguey sierruda (*Agave americana americana*), Maguey sierrudita (*Agave americana*), Cuishe (*Agave rhodacantha*) y Agave tobalá (*Agave potatorum*) con un total de 10 quistes observados (Figura 2).



Figura 2. Quiotes de agaves en Proyecto LAM 2021 (Fotografía: M. Domínguez-Laso).

En la mayoría de los agaves en floración se pudo observar que la antesis de las flores inició al atardecer y permaneció en este proceso entre cuatro y cinco días. La fase estaminada de la flor (fase masculina) presentó una duración de dos noches; en la tercera noche ocurrió la dehiscencia de las anteras. Al término de la fase estaminada, la flor entró a la fase pistilada (fase femenina) y, por último, en la cuarta noche se presentó la máxima elongación del pistilo y la receptibilidad del estigma (Figura 3).



Figura 3. Proceso de la antesis de las flores de maguey, iniciando con el rompimiento de floración, fase estaminada y fase pistilada de A) *A. americana*, B) *A. potatorum* y C) *A. rhodacantha* (Fotografía: M. Domínguez-Laso)

Por otro parte, se pudo observar que la producción de néctar se presenta durante toda la antesis de la flor (tanto de día como de noche), debido a la hidrólisis enzimática que transforma el polisacárido de reserva en los azúcares simples que conforman el néctar, el cual atrae a un amplio número de especies nectarívoras para llevar a cabo la polinización, no obstante que este esfuerzo reproductivo signifique su muerte (Jaques-Hernández & Salazar, 2009). Así mismo, confirmamos que la mayor producción de néctar ocurre durante la noche, tal como lo describe Rosas-Guerrero *et al.* (2014).

Dado que los agaves presentan síndrome floral, como la polinización nocturna quiropterofilia (síndrome de polinización en el que las plantas están adaptadas para atraer murciélagos), así como la dehiscencia de las anteras, momento en el que abren liberando el polen que será transportado por alguno de sus polinizadores y posteriormente da pie a la máxima receptibilidad del estigma (Figura 4), se concluye que este patrón de biología floral es similar a lo reportado por diversos estudios sobre otras especies de agave en el norte y occidente de México realizados por Arizaga *et al.* (2000); Slauson (2000); Molina-Freaner & Eguiarte (2003); Castillo-Hernández & Treviño-Carreón (2009).



Figura 4. Dehiscencia de las anteras, la receptibilidad del estigma con polen adherido a la pared donde secreta el líquido estigmático que será el que lo canalice al ovario (Fotografía: M. Domínguez-Laso)

Como parte de sus estrategias reproductivas, la planta cuenta con estructuras especializadas: tejido epidérmico periantal, el cual contacta directamente con agentes abióticos (luz, humedad, calor) y bióticos (animales polinizadores). Estas estructuras pueden favorecer la atracción de polinizadores o, por el contrario, repeler a los ladrones de polen y néctar (Whitney *et al.*, 2009 a y b; Ojeda *et al.*, 2012). A su vez, estas estructuras pueden generar refracción de la luz durante la noche (Figura 5). Tal como se pudo evidenciar a través del registro fotográfico, donde se constata que, durante la noche, las flores son más visibles, reconocibles y atractivas para los polinizadores.

Un rasgo floral que se ha demostrado en otros estudios es el de los patrones de color contrastante, ya que estos pueden actuar como guías para los polinizadores y ayudarlos a buscar alimento al resaltar la ubicación de las flores, o bien pueden aumentar la visibilidad al usar colores que contrastan fuertemente.

Los patrones pueden ocurrir en el rango de longitud de onda visibles para el ojo humano, pero también son comunes en la región del espectro ultravioleta (Whitney *et al.*, 2009c).

Lo anterior fue documentado a través de una serie de fotografías de fluorescencia visible inducida por radiación ultravioleta (UVIVF). Este fenómeno es producido cuando ciertos materiales que emiten luz visible son expuestos a este tipo de luz. Esta técnica fue empleada con la finalidad de indagar las estrategias de la planta para atraer a sus polinizadores, a través de las guías de néctar que contrastan con la flor y estas a su vez emiten un mensaje visual para atraerlos.



Figura 5. Panícula de la flor de maguey, visión normal y visión de la iridiscencia expresada con el uso de la técnica UVIVF (Fotografía: M. Domínguez-Laso)

La iridiscencia expresada con el uso de la técnica UVIVF en las flores de agave demuestra que los patrones florares ayudan a los polinizadores a orientarse y podrían usar la direccionalidad del color para alimentarse de manera más eficiente (Figura 5). Sin embargo, se requieren más estudios para poder determinar si es a través de estos mecanismos estructurales cómo las flores muestran a los polinizadores su ubicación y con ello contribuyen de manera positiva a la polinización cruzada.

Por otra parte, en cuanto a la técnica de registro, dado que existe poca información al respecto, es necesario seguir experimentando para mejorar los resultados y tener mejor interpretación de cómo los patrones florares ayudan a los polinizadores a ser atraídos y orientados a las flores.

Conclusiones

La documentación fotográfica de la fenología floral confirma que las flores de los agaves presentan síndrome floral de quiropterofilia, son más fértiles durante la noche, lo que significa que las plantas están adaptadas para atraer murciélagos como polinizadores nocturnos (Figura 6).

Lo anterior se demuestra tras observar la elongación del pistilo durante la quinta noche y el cambio del estigma a una forma excitada y la secreción de un líquido viscoso que permite que el polen quede atrapado cerca del estigma (Figura 4).



Figura 6. Registro de algunos polinizadores nocturnos como murciélagos del género *Leptonycteris* en PLAM durante el estudio de fenología floral de agaves (Fotografía: M. Domínguez-Laso)

Así mismo, se comprueba que una vez que existe el rompimiento de floración, la planta produce néctar durante 24 horas continuas, lo que permite a diversos insectos y aves visitar la planta a lo largo del día para alimentarse; sin embargo, sólo los visitantes nocturnos son quienes realmente realizan la acción de polinización de la planta.

A través de la fotografía UV pudimos concluir que aun cuando los agaves se encuentren en zonas totalmente oscuras (sobre todo en su hábitat natural), emiten una refracción de la luz que permite a los murciélagos y polillas identificar su posición para alimentarse; siendo esta coloración una estrategia para facilitar el trabajo de los polinizadores, asegurando la sobrevivencia de la especie.

Finalmente, se tiene la hipótesis de que una vez que un murciélago encuentra un grupo de agaves floreciendo, hace un registro del lugar y cada año vuelve sobre esa ruta en busca de alimento, por lo que será necesario plantear estudios que nos permitan documentar la incidencia de los murciélagos que visitan cada año el jardín de plantas madre.

Referencias

- Ángeles-Carreño, G. C., & Domínguez-Laso, M. (2022). Proyecto LAM, una propuesta de sustentabilidad desde el campo para el campo. *Suplemento informativo de La Jornada del Campo*. Núm. 183: 14p.
- Arizaga, S., Ezcurra, E., Peters, E., Ramírez, E., & Vega, E. (2000). Pollination ecology of *Agave macrocartha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanism. *American Journal of Botany*, 87, 1004-1010. <https://doi.org/10.2307/2657001>
- Castillo-Hernández, H., & Treviño-Carreón, J. (2009). Biología Floral de *Agave gentryi* ullrich (Agavaceae) en la localidad de La Marcela, Miquihuana, Tamaulipas. *CienciaUAT*, 4(2), 62-66.
- García-Mendoza, A. J. (2004). Agaváceas. En A. García-Mendoza, M. Ordoñez & M. Briones-Salas (eds.), *Biodiversidad de Oaxaca* (pp. 159-160). Instituto de Biología-Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. ISBN: 9703220452
- García-Mendoza, A. (2011). Agavaceae. En R. Medina (ed.), *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 88* (pp. 95). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana*, 126, e1461. DOI: 10.21829/abm126.2019.1461.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. 670 p.
- Good-Ávila, S. V., Souza, V., Brandon, S., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *PNAS*, 103 (24), 9124 - 9129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103>
- Hutchinson, J. (1934). *The families of flowering plants. Vol. II. Monocotyledons*. The Macmillan Co.
- Jacques-Hernández, C., & Salazar Bravo, A. (2009). Caracterización y uso de las especies de agave de Tamaulipas. *Ciencia y Conocimiento Tecnología*, 89, 91-101. <https://www.researchgate.net/publica>

- tion/264495893_Caracterizacion_y_usos_de_las_especies_de_agave_en_Tamaulipas
- Magaña-González, K. C., Vázquez-García, J. A., & Reyna-Bustos, O. F. (2007). Visitantes florales en *Agave valenciana* (Agavaceae) en Mascota, Jalisco: Observaciones preliminares. En J. Vázquez-García, M. Cházaro Basáñez, E. Flores-Berrios, G. Hernández-Vera & Y. Vargas-Rodríguez (eds.). *Agaves del Occidente de México. Serie Fronteras de Biodiversidad 3* (pp. 32-36). Universidad de Guadalajara-Consejo Regulador del Tequila AC.-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.-CONAFOR. ISBN: 978-970-27-1293-0.
- Molina-Freaner, F., & Eguiarte, L. E. (2003). The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators. *American journal of botany*, 90(7), 1016–1024. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.7.1016>
- Ojeda, I., Santos-Guerra, A., Caujapé-Castells, J., Jaén-Molina, R., Marrero, A., & Cronk, QCB. (2012). Comparative Micromorphology of Petals in Macaronesian Lotus (Leguminosae) Reveals a Loss of Papillose Conical Cells during the Evolution of Bird Pollination. *International Journal of Plant Sciences*, 173, 365-374. <https://doi.org/10.1086/664713>
- Slauson, L. A. (2000). Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany*, 87, 825-836. <https://doi.org/10.2307/2656890>
- Starr, G. D. (2021). Agaves of Oaxaca: Part One. Two recently described species: *Agave megalodonta* and *Agave quiotepencensis*. *Cactus and Succulent Journal*, 93 (3), 226–237. <https://doi.org/10.2985/015.093.0309>
- Troiani, H. O., Prina, A. O., Muiño, W. A., Tamame, M. A., & Beinticino, L. (2017). *Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía 1ª ed.* Universidad Nacional de la Pampa. ISBN 978-950-863-321-7 326p. <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/110>
- Whitney, H. M., Chittka, L., Bruce, T. J. A., & Glover, B. J. (2009a). Conical epidermal cells allow bees to grip flowers and increase foraging efficiency. *Current Biology*, 19, 948-953. DOI 10.1016/j.cub.2009.04.051

- Whitney, H. M., Federle, W., & Glover, B. J. (2009b). Grip and slip: mechanical interactions between insects and the epidermis of flowers and flower stalks. *Communicative & Integrative Biology*, 2, 505-508. DOI 10.4161/cib.2.6.9479
- Whitney, H. M., Kolle, M., Álvarez-Fernández, R., Steiner, U., & Glover, B. J. (2009c). Contributions of iridescence to floral patterning. *Communicative & Integrative Biology*, 2, 230-232.

5.2 RESILIENCIA SOCIOCULTURAL EN EL ALTO MEZQUITAL, HIDALGO: EL MAGUEY COMO SÍMBOLO DE IDENTIDAD Y SUBSISTENCIA

Doris Arianna Leyva-Trinidad¹, Abel Alberto Verdugo-Fuentes^{2*}, Sergio Erick García-Barrón³ y Juan Pablo Pérez-Camarillo⁴

RESUMEN

El maguey es un elemento representativo en la vida de los pueblos mesoamericanos y la historia cultural del altiplano mexicano, pero a pesar de su importancia cultural, social, ambiental y económica en la cultura *bñähñu*, su cultivo ha disminuido. El objetivo de este estudio es profundizar en la motivación que impulsa a los agricultores de El Cardonal, Hidalgo, a continuar con el cultivo del maguey, a pesar de la desvalorización y pérdida de identidad que ha experimentado esta planta. El trabajo se realizó empleando técnicas cualitativas como entrevistas semiestructuradas (n=100) a profundidad con informantes claves (n=10), así como observación participante. La permanencia del maguey se mantiene a pequeña y mediana escala porque forma parte de la economía campesina a nivel familiar y comunal. A nivel familiar se practica una agricultura temporal con la siembra intercalada de maíz, frijol y otras especies asociadas al metepantle. La producción

¹ Coordinación de Desarrollo Regional, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Gustavo Enrique Astíazarán Rosas Núm. 46, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

² Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de febrero 818 Sur. Col. Centro. Cd. Obregón, Sonora, 85000, México. * abel.verdugo@itson.edu.mx

³ Biotecnología industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero No. 1227, El Bajío, CP 45019, Zapopan, Jalisco, México.

⁴ Prestador de Servicios Profesionales

y comercialización de barbacoa de borrego es uno de los usos más destacados del maguey en la cultura *hñäbhñu*, así como la obtención de pulque y flores. Otros usos son la penca para la alimentación de borregos y la obtención de fibra y aguamiel para la elaboración de miel de maguey. A pesar de los precios poco atractivos y las plagas, los productores persisten en el cultivo de las variedades de maguey para satisfacer sus necesidades básicas de alimentación y vivienda. Además, el cultivo del maguey puede contribuir al desarrollo sustentable de las comunidades rurales. En conclusión, el maguey sigue formando parte de la cotidianidad en los modos de vida y medio de subsistencia de las familias del Alto Mezquital. De esta manera, su cultivo sí representa una alternativa económica y puede contribuir a detonar el desarrollo sustentable de las comunidades rurales. Es necesario un programa de reforestación para evitar la extinción de la especie y fomentar su conservación.

PALABRAS CLAVE: Modos de vida, manejo del maguey Otomí.

Introducción

México está formado por 68 pueblos indígenas, en Hidalgo se encuentran los otomíes, nahuas, pames y tepehuas, quienes han mantenido su cultura y tradiciones ancestrales (Báez *et al.*, 2012). Las lenguas principalmente habladas en el estado son náhuatl, otomí, tepehuas y totonaco, siendo el náhuatl el más hablado (INPI, 2020; INEGI, 2020).

El Valle del Mezquital en Hidalgo, México, es una región importante dividida en tres subregiones con características de suelo particulares. Esta región alberga a la población otomí o autodenominada *hñäbhñu* que significa *HÑÄ* (habla) y *HÑU* (nariz) (fosas nasales); el que habla usando las fosas nasales (Arroyo Aguazu, 2020). La subregión del Alto Mezquital es la más relevante cultural, social y económicamente, pero enfrenta altos índices de marginación y pobreza debido a las condiciones geográficas y edáficas (Cubero, 2012; Fuzailov *et al.*, 2018; Leyva, 2020). Los habitantes de la región han desarrollado una agricultura de

temporal utilizando conocimientos ancestrales y destacando el sistema tradicional de metepantle, que permite la coexistencia de una diversidad de cultivos y platillos alimentarios obtenidos de la recolección (Caraza-Campos, 2010; Chairez, 2010; Peña Sánchez, 2012).

Lo anterior destaca la importancia social y cultural del maguey en México, que data de hace 10,000 años. A pesar de que México es el centro de diversidad biológica del agave, actualmente existe una advertencia de su desaparición debido a factores económicos, políticos, ambientales y socioculturales. Este capítulo se enfoca en las comunidades otomíes de El Cardonal, Hidalgo, quienes preservan la producción de maguey y sus subproductos. Además, se busca profundizar en la motivación que impulsa a los agricultores a continuar con el cultivo del maguey, a pesar de la desvalorización y pérdida de identidad que ha experimentado esta planta.

Materiales y métodos

El Cardonal es un municipio importante en la subregión del Alto Mezquital, Hidalgo, México (SIAP, 2018). Tiene una superficie de 593.65 km² y 81 localidades activas. Su clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, una escasa precipitación de 409 mm anuales y temperatura promedio de 13-21°C en los meses más calurosos y su fisiografía es de altiplano, con llanuras, lomeríos y una parte en el eje Neovolcánico. Cuenta con varias fuentes hidrológicas y seis tipos de suelos. La flora incluye plantas como cardón, maguey, mezquite, huizache, garambullo, olote, liga, nopal, biznaga, pitaya, entre otras. La fauna está conformada por águila, lagartija, coyote, camaleón, tejón, ardilla, tlacuache, onza y una variedad de aves cantoras, insectos y reptiles. La agricultura es de temporal, con un periodo de cuatro a cinco meses para producir cultivos. La ganadería es escasa y se da a nivel familiar.

Trabajo de campo y análisis de la información

Se realizó una investigación exploratoria etnográfica y etnoecológica en comunidades otomí utilizando la técnica de muestreo bola de nie-

ve y entrevistas semiestructuradas (n=100) y a profundidad (n=10) (Quintana Peña, 2006; Guber, 2015). Se indagó sobre aspectos relacionados con la agricultura y se analizó la información mediante un análisis descriptivo con Microsoft Excel 2022. Se obtuvo la aprobación de la autoridad local y el permiso de los informantes para utilizar la información compartida.

Resultados y discusión

Características de la población otomí

El estudio reveló que la edad promedio de los jefes de familia es de 51 años, con un rango de 42 a 60 para hombres y 35 a 55 para mujeres. Las unidades de producción familiar suelen tener tres o cuatro integrantes y predominan las familias nucleares (61%) sobre las extensas (49%). Ambos tipos de familia funcionan como un organismo que se basa en el apoyo y la cooperación de todos los integrantes de la unidad familiar y de otras familias, mediante una lógica basada en la división de la fuerza trabajo agrícola y actividades extra-finca, lo cual les permite el sustento y la reproducción familiar, en donde cada integrante cumple un rol específico, ya sea como fuerza de trabajo o en la generación de ingresos económicos de acuerdo con el género y la edad. Existe una división del trabajo en donde las actividades que demandan mayor fuerza son realizadas por el hombre; las de menor esfuerzo y del hogar, por las mujeres e hijos, pero, además, por su propia seguridad. Por ejemplo, el pastoreo es una actividad que demanda poca fuerza de trabajo y es realizada principalmente por las amas de casa y los hijos, en donde los animales (borregos, chivos, cabras) son llevados al monte durante casi ocho horas al día. Esta actividad es muy característica de los municipios pertenecientes al Alto Mezquital. Aunque la responsabilidad de las actividades agrícolas sigue recayendo en el jefe de familia, se observa una creciente incorporación de las mujeres como poseedoras de la tierra y productoras agrícolas, ya que culturalmente solo se reconocía a los hombres en los censos agropecuarios (Deere & Twymán, 2014). Actualmente,

en dicha subregión se empiezan a dar ciertos “arreglos familiares”, en donde la mujer en situaciones como migración o viudez sustituye al hombre de manera temporal o permanente en las decisiones del hogar y en las actividades agrícolas.

El 87% de la población cuenta con educación formal. De estos, el 42% cuenta con estudios a nivel secundaria y solo 9% tiene estudios a nivel licenciatura, lo que quizá sea una causa que facilite la aplicación de transferencia y adopción de tecnología en los sistemas productivos. La migración es principalmente de jóvenes y el 60% de los encuestados tienen familiares en el extranjero, de los cuales el 47% envían remesas a sus familias. Los montos de envío varían desde \$200.00 hasta \$10,000.00, con un promedio de \$2,500.00 y periodos frecuentes de remesas mensuales y semestrales.

El 70% de los productores en el Alto Mezquital practican una agricultura tradicional, complementada con otras actividades, mientras que el resto utiliza técnicas de agricultura de riego y se enfoca en el cultivo de maíz, alfalfa, forrajes y hortalizas. Además, se dedican a la cría y explotación de diversos animales para autoconsumo y venta local. La producción en el Alto Mezquital es incipiente debido a las condiciones del suelo y clima, lo que lleva al 53% de los encuestados a realizar trabajos extrafinca para complementar sus ingresos (Tabla 1). Estos trabajos incluyen empleos en ciudades de la región y otros países como Estados Unidos y Canadá, generando beneficios económicos para las familias y dinamismo en las actividades productivas. Las remesas desempeñan un papel fundamental como fuente de sustento para los núcleos familiares, al mismo tiempo que complementan los desembolsos relacionados con las labores agrícolas y pecuarias, así como los costos asociados con la alimentación, atención médica, educación, indumentaria y actividades recreativas de la familia.

En el territorio, la mayoría de la tierra es de tenencia privada (70%) y ejidal (23%), con una superficie promedio de 2 ha y modalidad de temporal. En México, según SAGARPA (2012), existen estratos de Unidades Económicas de Agricultura Familiar, en donde la Agricultura Familiar de Subsistencia (AFG) se caracteriza por tener una superficie de terrenos o hectáreas de poca extensión, típica de las zonas de alta y

muy alta marginación. A pesar del trabajo en las parcelas y la ordenación en El Cardonal, la actividad agrícola es de temporal y depende de las condiciones climáticas características de las zonas áridas, en donde la producción es prácticamente para autoconsumo. No obstante, el tipo de agricultura es una demostración de la armonía que rige las relaciones entre los ciclos de las sociedades campesinas y los ciclos de la naturaleza (Granados-Sánchez, 2014). Sin embargo, los programas gubernamentales como PROCAMPO han llevado a una mínima práctica agrícola necesaria para recibir el subsidio, lo que genera una imagen de actividad agrícola en la región que no es real, caracterizada por el envejecimiento del campo.

El maguey como modo de vida

En México, los agaves han sido y son de gran importancia económica y cultural para los pueblos originarios y mestizos, debido a que han sido fuente de diversos aprovechamientos, principalmente en zonas áridas y semiáridas. En Hidalgo, el cultivo del maguey es importante para la economía familiar y comunal en el Alto Mezquital y su empleo como alimento y fuente de fibras aún permanece. En la región existen 6 principales variedades: maguey verde, maguey manso, maguey ayoteco, maguey chalqueño, maguey pua larga y maguey xaminí, siendo este último la principal variedad en cuanto a extensión e importancia social, cultural, económica y productiva. Además, en idioma *HñäHñu* (otomí), los habitantes nombran 13 variedades de agave (Ramsay, 2004).

Los productos derivados de las variedades de maguey ayudan a aumentar los ingresos anuales. La agricultura temporal se practica para autoconsumo mediante el establecimiento intercalado de maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), calabaza (*Cucurbita* spp.) y otras especies como los quelites, en hileras de maguey en un sistema agroforestal conocido como metepantle, lo que ha permitido la permanencia de la cultura *hñäbñu*. La lógica de esta combinación de cultivos es debido a que el frijol fertiliza el suelo mediante la incorporación de nitrógeno, las hojas grandes de la calabaza conservan la humedad del suelo y evitan la proliferación de arvenses y el maguey,

por su parte, evita la erosión del suelo y provee de alimentos y recursos económicos durante todo el año. La producción y comercialización de barbacoa de borrego, cuyo insumo principal son las pencas del maguey, es una actividad importante en este sistema productivo. El maguey Xamini o maguey pulquero, también conocido como *Agave salmiana*, es la principal especie altamente valorada en la región debido a su versatilidad y multiplicidad de usos. Sus hojas crecen en rosetas, son grandes y gruesas, de color verde con bordes dentados y puntas afiladas (Narváez Suárez *et al.*, 2016). Esta especie es originaria de México y es fundamental en los modos de vida, las estrategias campesinas, la cotidianidad, las tradiciones y la cultura de la zona.

El municipio es conocido por la producción tradicional de pulque, aunque en los últimos años ha disminuido debido a la falta de magueyeras y tlachiqueros jóvenes interesados en la actividad. Actualmente, el cultivo de maguey se utiliza comúnmente como una forma de cerco vivo para delimitar parcelas. Hace más de 50 años el pulque fue reemplazado por la cerveza en la región, lo que ha llevado a una disminución en la demanda y a un bajo precio de venta. Como resultado, en los últimos 20 años han surgido talleres y cooperativas de aguamiel concentrado en busca de un mercado local más rentable. La producción de pulque sigue siendo principalmente para el autoconsumo y venta familiar, pero también se produce y comercializa la bebida curado, que agrega valor e ingresos económicos.

El cultivo de maguey tiene múltiples usos, además de la producción de pulque y aguamiel, como la obtención de fibra de ixtle para diferentes productos, el uso de las hojas en la alimentación y construcción y la comercialización de plantas e hijuelos entre los productores locales. A pesar de la presión comercial debida a agentes externos, la producción de maguey se mantiene en más de 1,500 hectáreas y es esencial el incremento de la superficie a través de programas de reforestación sostenible. Existen esfuerzos del gobierno, instituciones estatales y grupos de productores para impulsar y conservar esta especie en la región, ya que su extinción tendría un impacto ambiental negativo. Además de las formas tradicionales de aprovechamiento del maguey, se están explorando nuevas alternativas para innovar y agregar valor,

como la extracción de fructanos, celulosa, producción de bioetanol y elaboración de hidromiel. La búsqueda de nuevas alternativas permitiría la conservación de la tradición y la generación de productos derivados del maguey (Viniegra, 2021).

La economía del maguey

La agricultura de temporal en Hidalgo está en crisis, lo que ha llevado a la falta de bienestar social y económico para los agricultores, así como a la falta de autosuficiencia alimentaria. Si se mantiene el actual sistema agroalimentario corporativo, los agricultores de comunidades rurales e indígenas continuarán viviendo en la marginación, la pobreza y con altas tasas de migración. En cuanto a la producción de maguey, es el segundo cultivo más importante en términos de superficie destinada a la siembra con 804 hectáreas. En 2018 se cosecharon 75 hectáreas, produciendo 855 toneladas con un rendimiento de 11.4 toneladas por hectárea y un valor de producción de \$4,446,000 MXN. En El Cardonal se contabilizaron 647 hectáreas destinadas a la siembra de maguey pulquero, con una superficie cosechada de 230 hectáreas en el ciclo agrícola 2018, lo que resultó en una producción de 18,860 miles de litros con un rendimiento de 82 miles de litros por hectárea y un valor de producción de \$135,792,000 MXN.

Tabla 1. Información estadística de la producción agrícola del sistema maguey y maguey pulquero en el municipio Cardonal en el año agrícola 2018

Descripción	Cantidad
Maguey	
Superficie sembrada (ha)	804
Superficie cosechada (ha)	75
Volumen de producción (t)	855
Rendimiento (t/ha)	11.4
Valor de producción (MXN)	\$4 446 000.00
Maguey pulquero	
Superficie sembrada (ha)	647
Superficie cosechada (ha)	230
Volumen de producción (miles de L)	18 860

Rendimiento (miles de L/ha)	82
Valor de producción (MXN)	\$135 792 000.00

Fuente: Servicio de Producción Agropecuaria y Pesquera SIAP (SIAP, 2018)

Entre los productores de maguey existe una clara diferencia, ya que el 70% sigue practicando métodos agroecológicos en condiciones de temporal, combinando conocimientos y tecnologías tradicionales para sobrevivir en un entorno que no favorece la agricultura intensiva. Esta forma de agricultura demuestra la armonía entre las sociedades campesinas y la naturaleza (Granados-Sánchez, 2014). Un 25% de los productores utiliza aguas residuales y tecnología para producir hortalizas y maguey, mientras que sólo el 5% trabaja con grandes extensiones de maguey bajo un modelo intensivo.

En el municipio del Cardonal (Tabla 1), el sistema de producción de maguey incluye una superficie de siembra de 804 ha para el cultivo de maguey y 647 ha para el cultivo de maguey pulquero (SIAP, 2018). Los insumos utilizados son plántulas y/o hijuelos, y aunque no es rentable, los productores continúan sembrando y comercializando el maguey y sus derivados para el autoconsumo, lo que les permite mantener su cultura ancestral. La economía campesina se basa en el trabajo en familia y la producción para el autoabasto, utilizando estrategias para mejorar en cada ciclo agrícola y adaptarse a los cambios del entorno (Altieri & Nicholls, 2013).

El maguey es un cultivo importante en la región, aunque a menudo se asocia con pobreza y atraso cultural. A pesar de esto, los productos derivados se comercializan localmente y generan ingresos para el 75 % de los productores. El cultivo de maguey ayuda a detener la erosión del suelo, pero los productores enfrentan presiones económicas y buscan fuentes alternativas de ingresos debido a la migración y problemas de comercialización. Es necesario desarrollar estrategias para mejorar la cadena productiva del maguey y fomentar su cultivo de manera sostenible para mejorar la calidad de vida de los productores y sus familias. La preservación del cultivo se considera irracional desde la perspectiva de los políticos y tomadores de decisiones (Landini, 2012).

El maguey en la alimentación hñähñu

La gastronomía tradicional del Valle del Mezquital se distingue por ser un elemento clave de su identidad cultural, en la cual el maguey juega un papel importante. La elaboración de los platillos tradicionales depende de las materias primas endémicas y es fundamental asegurar la disponibilidad de los ingredientes necesarios (García-Barrón *et al.*, 2022). Desde tiempos prehispánicos, el maguey ha sido un componente importante en la alimentación de la región, ya sea como ingrediente o como proveedor de otros elementos. A continuación, se detallan los diferentes platillos donde el maguey es un componente fundamental.

Pencas de maguey para la elaboración de barbacoa: La barbacoa es un platillo tradicional que normalmente se prepara con carne de borrego, aunque también se puede hacer con pollo. Para la cocción se utilizan hornos de tierra y las pencas de maguey son un ingrediente fundamental para aportar sabores y aromas al platillo. Antes de usarse, las pencas deben asarse para flexibilizarlas y envolver la carne, evitando que esté en contacto directo con el fuego (Avilés Cano, 2015; Larousse Cocina, 2021).

Chinicuales: *Chinicuil*, del náhuatl *chilocuilin*, que significa “gusano de chile”. Son una plaga que ataca al maguey (especialmente a las especies *Agave angustifolia* y *Agave salmiana*) durante la temporada de lluvias, horadando los tallos y hojas (Dampf, 1927; Llanderal-Cázares *et al.*, 2017). La forma más común de prepararlos es frita dentro de una olla de barro y consumidos en tacos o bien en salsas rojas (Barros & Buenrostro, 2002).

Gusano blanco de maguey (*Acentrocneme hesperiaris*): Larva de una mariposa que crece en el centro de las pencas basales del maguey. La temporada de producción y consumo es en primavera y verano. Su origen es primordialmente en Hidalgo. Este gusano de color blanco lejos de ser una plaga dañina, ha alcanzado una importancia a nivel económico y un alto prestigio gastronómico, siendo apreciado por todos los sectores de la sociedad mexicana. Comúnmente se consumen tostados o fritos, acompañados con tortillas de maíz en forma de taco.

Gualumbos: La flor de maguey, también conocida como gualumbo (del otomí, “*uadombo*”; “*uadd*” maguey; “*don*” flor y “*bo*” quiote), es un manjar privilegiado en la gastronomía de México. Debido a que el maguey florece una sola vez en su ciclo de vida, los habitantes de las comunidades indígenas no extraen todas las flores para preservar la especie. Los gualumbos se consumen antes de florecer y se recomienda desfleamarlos para quitar el tallo y el pistilo, dejando solo el pétalo. Son una excelente fuente de proteína y se consumen tradicionalmente durante la cuaresma, ya que su temporada de floración coincide con esa fecha (Osegueda, 2021; Urbina, 2020).

Mixiotes: El *mixiote* es un plato tradicional del Valle del Mezquital que consiste en carne enchilada cocida al vapor, envuelta en una película que se desprende de la penca de maguey pulquero. La palabra *mixiote* proviene del náhuatl y se refiere a la hoja que se desprende de la cutícula del maguey. Antes de su uso, se remoja en agua para que esté flexible. Este platillo se prepara con carne de borrego y una salsa de chiles, y se cree que su origen se encuentra en el sur de la Altiplanicie mexicana (Larousse Cocina, 2023).

Pulque: El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana hecha de la savia del agave pulquero, con una graduación alcohólica de 4° a 7° GL (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). Era consumido en ceremonias en la época prehispánica y alcanzó su auge en el siglo XIX y principios del XX, pero el cambio en los hábitos de consumo llevó a su disminución (Fernández & Deraga, 2009; Robledo-Márquez *et al.*, 2021; Rojas-Rivas *et al.*, 2019). En la actualidad, el pulque ha recuperado su popularidad, especialmente entre los jóvenes consumidores (Rojas-Rivas *et al.*, 2019).

Ximbó: En otomí del Valle del Mezquital significa “envoltura o envuelto” y deriva de las raíces *xi* (penca) y *mbo* (de), “dentro de la penca”. Entre los otomíes en Hidalgo se designaba ximbó a cualquier preparación envuelta en penca de maguey y cocida en horno de tierra (Avilés Cano, 2015). Constituye una forma de hacer “barbacoa” utilizando pollo o cerdo, principalmente acompañado de verduras como el nopal y especias, así como chiles secos molidos (Avilés Cano, 2015).

Principales problemas que afectan el maguey

La producción de maguey en el Cardonal se ha visto afectada por la presencia de plagas y enfermedades que afectan el ciclo de vida del cultivo. Las plagas y enfermedades más comunes son:

- a. el hongo fitopatógeno que causa la enfermedad llamada **Viruela o negrilla** causada por un hongo que produce pequeñas áreas oscuras parecidas a manchas en las hojas. Este problema se observó en plantas adultas y que afecta principalmente a los hijuelos (Figura 1a).
- b. **Escama armada** conocida como “roña”, que es ocasionada por el insecto *Acutapsis agavis* que está cubierto por una capa cerosa de forma circular y color café. Dicho insecto succiona la savia y excreta líquidos azucarados que pueden atraer hongos oportunistas, que a menudo también tiene la infección fúngica llamada fumagina (*Capnodium* spp) (Figura 1b).



Figura 1. Plantas de maguey infectadas por viruela (a) y escama armada (b)

- c. **Picudo del agave** (*Scyphophorus acupunctatus*) cuyas larvas y adultos causan perforaciones en la penca y pudrición blanda, junto con la presencia de otros microorganismos que

contribuyen al deterioro de la planta. Las larvas del insecto son de color blanco cremoso, con forma de “C”, sin patas, con cuerpo segmentado y estriado; los adultos suelen encontrarse en la base de las pencas y en las piñas, los cuales se caracterizan por tener un color negro brillante, mide de 1.25 a 2.5 cm de largo con pico bien desarrollado y encorvado. El daño que se ha observado en el cultivo es perforaciones y secreciones gomosas en la penca, causando pudrición blanda con ligero olor putrefacto. Además, la presencia de una coloración de rojiza a negra en el tallo o bola de la planta, lo que sugiere la presencia de otros microorganismos como bacterias que contribuyen al deterioro y muerte de la planta (Figura 2). Algunos productores consideran que las afectaciones por picudo debilitan el sistema inmune de la planta, lo que permite que el maguey sea susceptible a enfermedades fúngicas como Mancha gris (agente causal: *Cercospora agavicola*), Marchitez (agente causal: *Fusarium oxysporum*), Mancha anular (ocasionada por hongos *Phoma sp.*, *Alternaria sp.* y la bacteria *Erwinia sp.*), Mancha marginal (causada por el hongo *Didymosphaeria sp.* y *Nectria sp.*).



Figura 2. Plantas de maguey colonizadas con picudo del agave: daño por picudo en penca (a), estados larvarios (b) y adulto del insecto (c)

Los productores de El Cardonal identifican al picudo como la plaga de mayor importancia económica, ya que puede afectar a gran

cantidad de plantas y provocar pérdidas significativas en la producción de pulque y otros subproductos del maguey. A pesar de la importancia del picudo, los productores locales desconocen cómo controlar esta plaga y no cuentan con tecnología adecuada para prevenir su aparición. En las estrategias de control, los productores han empleado trampas de feromonas atrayentes que facilitan la captura de esta plaga; así como la quema de plantas infectadas. Sin embargo, se sabe que el uso excesivo de pesticidas puede ser contraproducente, ya que puede afectar la calidad del pulque y otros subproductos del maguey. Por esta razón, los productores de la zona buscan alternativas para controlar el picudo del maguey y el chapulín mediante podas de saneamiento en las plantas infestadas, la limpieza de las áreas de cultivo para evitar la propagación de los insectos y la introducción de depredadores naturales, en el caso del picudo y gallina ciega (plaga que causa daños a la raíz en los dos primeros años de la plantación). A pesar de estos esfuerzos, la plaga sigue siendo un desafío importante para la producción de maguey en la zona.

Para el control de algunas plagas, algunos productores aplican ceniza y cal alrededor de la planta y, escasamente, utilizan pesticidas para combatirlas, sin embargo, la mayoría de ellos no utilizan métodos de control biológico. Otros productores preparan el caldo bordelés (sulfato de cobre, cal y agua), en el cual los hijuelos son sumergidos e inmediatamente plantados. El manejo escaso e inadecuado del cultivo es uno de los principales problemas que permiten la proliferación de plagas y enfermedades. Se sugiere implementar estrategias de acompañamiento y capacitación técnica por parte de instituciones gubernamentales e instituciones de investigación para el manejo óptimo de los agaves basado en podas, eliminación de agaves enfermos, manejo del cultivo y estrategias de control de fitopatógenos. Actualmente, Sanidad Vegetal del estado de Hidalgo apoya a productores con feromonas (como atrayente) e insecticidas para la colocación de trampas de picudo, en donde cada 15 días envían el reporte de registro de picudo en las trampas. Por lo tanto, es urgente la reforestación escalonada con esta especie vegetal para conservar el cultivo, el suelo y el medio ambiente y para abastecer las demandas del mercado.

Conclusiones

La continua preservación de la práctica de cultivar maguey en el contexto de las actividades diarias y los sustentos, ya sean parciales o integrales, de las familias en la región del Alto Mezquital, permanece como un símbolo de identidad cultural y territorial. Dentro de este marco, la ejecución de esta actividad agrícola demuestra su capacidad como opción económica realista, capaz de catalizar un desarrollo sostenible en las comunidades rurales de Hidalgo. No obstante, esta potencialidad se ve influenciada por la inherente incertidumbre que rodea el cultivo del maguey. Dicha incertidumbre está moldeada por una serie de factores complejos y diversos, tales como la limitada escala de producción, la desinteresada actitud hacia el cultivo, el abandono de las labores agrícolas, la extracción descontrolada de las pencas, la susceptibilidad ante plagas y enfermedades, la migración de las zonas rurales a las urbanas y el envejecimiento demográfico del sector agrícola. La convergencia de estos elementos, cada uno con su propia influencia y dinámica, da lugar a un panorama sumamente complejo que plantea amenazas palpables y significativas a la sostenibilidad a largo plazo de esta práctica agrícola arraigada en la tradición. La interacción de factores como el cambio climático en curso, la pérdida acelerada de biodiversidad, las transformaciones en los patrones de consumo y la evolución de las políticas agrarias configuran un escenario desafiante. Es fundamental abordar de manera integral estos desafíos para asegurar tanto la continuidad del cultivo de maguey como el bienestar de las comunidades rurales involucradas. Garantizar la viabilidad futura del cultivo de maguey implica también explorar nuevas oportunidades de comercialización y valor agregado para sus productos derivados, de manera que las comunidades rurales puedan acceder a mercados más amplios y estables. Asimismo, se debe abogar por políticas agrarias que reconozcan la importancia cultural y ambiental del maguey, brindando apoyo financiero y técnico para su producción sostenible. La preservación de la práctica agrícola del maguey no solo resguarda una tradición ancestral, sino que también protege la diversidad biológica y contribuye a la resiliencia de los

ecosistemas. La atención holística a estos desafíos asegurará tanto la continuidad de esta valiosa actividad como el bienestar perdurable de las comunidades rurales arraigadas en su cultivo.

Agradecimientos

A los productores de maguey por compartir sus conocimientos y experiencias.

Referencias

- Altieri, M. A., & Nicholls, C. I. (2013). Agroecología y resiliencia al cambio climático: Principios y consideraciones metodológicas. *Agroecología*, 8(1), 7–20.
- Arroyo Aguazul, V. (2020). Educación matemática y enseñanza para la comprensión: el caso de la cultura hñahñu. *Articulando e construyendo saberes*, 5, 1-23. DOI:10.5216/racs.v5.59357
- Avilés Cano, R. (2015). *Patrimonio cultural gastronómico, turismo y signos distintivos de calidad: Innovaciones para el desarrollo económico territorial en Actopan, Hidalgo* [tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio UCM. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/27080>
- Baez, L., Garret, G., Pérez, D., Moreno, B., Fierro, U. J., & Hernández, M. G. (2012). *Los pueblos indígenas de Hidalgo: Atlas etnográfico*. Instituto Nacional de Antropología e Historia-Gobierno del Estado de Hidalgo-Consejo Estatal para la Cultura y las Artes de Hidalgo. <https://mediateca.inah.gob.mx/repositorio/islandora/object/libro%3A445>
- Barros, C., & Buenrostro, M. (2002). Cocina prehispánica. Continuidad cultural. Recetario. *Arqueología mexicana*, 12, 1–101.
- Caraza Campos, L. B. (2010). La gastronomía hidalguense, mezcla de tradiciones. *Guía México Desconocido*. <http://www.mexicodesconocido.com.mx/la-gastronomia-hidalguense-mezcla-de-tradiciones.html>.
- Chairez, A. (2010). Arte gastronómico (Hidalgo). *Guía México Desconocido*. <http://www.mexicodesconocido.com.mx/arte-gastronomico-hidalgo.html>.

- Cubero, L. B. (2012). *Los pueblos indígenas de Hidalgo: Atlas etnográfico*. Gobierno del Estado de Hidalgo.
- Dampf, A. (1927). Contribución al conocimiento de la morfología de los primeros estados de hypopta agavis Blázquez (chilodora Dyar) (lepidóptera, fam., cossidae): Plaga de los magueyes de la mesa central de México. *Estudios sobre las plagas de las plantas y de los animales de México*, 1, 1-26.
- Deere, C. D., & Twyman, J. (2014). ¿Quién toma las decisiones agrícolas? Mujeres propietarias en el Ecuador. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(3), 425-440.
- Fernández, R., & Deraga, D. (2009). The use of waste products in the fermentation of alcoholic beverages. En J. MacClancy, J. Henry & H. Macbeth (eds.), *Consuming the inedible: Neglected dimensions of food choice* (pp. 215-221). Berghahn Books.
- Fuzailov, I. E., Rybakova, N. I., & Paches, A. I. (2018). *México rural del Siglo XXI* (p. 25). FAO. <http://www.fao.org/3/i9548es/I9548ES.pdf>
- García-Barrón, S., Rivera-Muñoz, R., Camacho, D., Pérez-Camarillo, J., & Leyva-Trinidad, D. (2022). Representation of the concept “Traditional food”. *Agrociencia Uruguay*, 26(NE3):e964. doi:10.31285/AGRO.26.964.
- Granados-Sánchez, D., López-Ríos, G. F. & Hernández-Hernández, J. (2004). Agricultura nshanhu-otomí del Valle del Mezquital, Hidalgo. *Terra Latinoamericana*, 22(1):117-126. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57311208013>
- Guber, R. (2015). *La etnografía: método, campo y reflexividad (Primera ed)*. Siglo XX.
- Instituto Nacional de Geografía e Historia. (2020). *Cuéntame de México. Población*. INEGI. <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/hogares.aspx?tema=P>
- Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas. (2020). *Atlas de los pueblos indígenas de México. Otomíes*. <https://atlas.inpi.gob.mx/otomies-hidalgo-michoacan-y-estado-de-mexico/>
- Landini, F. P. (2012). Expectativas de los agentes de desarrollo rural argentinos sobre la Psicología y sobre la inserción profesional de los psicólogos en el ámbito de la extensión rural. *Inter-*

- disciplinaria*, 29 (2), 359- 377. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=18026361010>
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non distilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Larousse Cocina. (2021). Barbacoa. En *Diccionario enciclopédico de la Gastronomía Mexicana*. Consultado el <https://laroussecocina.mx/palabra/barbacoa-2/>
- Larousse Cocina. (2023). Mixiote. En *Diccionario enciclopédico de la Gastronomía Mexicana*. Consultado el . <https://laroussecocina.mx/palabra/mixiote/>
- Leyva Trinidad, D.A. (2020). *Diagnostico técnico productivo de las Unidades de Producción Familiar*. PRODETER Hidalgo, Región Cardonal-Santiago de Anaya: cadenas Maguey, Maíz, Olivo y Ovinos. Informe final. SADER, CIAD/CIDEA, SEDAGRO-H.
- Llenderal-Cázares, C., Castro-Torres, R., & Miranda-Perkins, K. (2017). Bionomics of *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847)(Lepidoptera: Cossidae). *SHILAP Revista de lepidopterología*, 45(179), 373–383.
- Narváez Suárez, A., Jiménez Velázquez, M. A., & Martínez Saldaña, T. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía agrícola*, (56),33-44.
- Osegueda, R. (2021, febrero 27). La flor de maguey, un delicioso platillo mexicano. *México Desconocido*. <https://www.mexicodesconocido.com.mx/la-flor-de-maguey-un-delicioso-platillo-mexicano.html>
- Peña Sanchez, Y. (2012). Estrategias de supervivencia doméstica aplicadas a la alimentación y salud del preescolar de El Cardonal, Hidalgo. En L. Báez-Cubero, G. Garret-Ríos, D. Pérez-González, B. Moreno-Alcántara, & J. A. Fierro-Alonso (eds.), *Pueblos indígenas de Hidalgo: Atlas etnográfico* (pp.). Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. http://www.cdi.gob.mx/dmdocuments/otomies_valle_mezquital.pdf

- Quintana Peña, A. (2006). Metodología de Investigación Científica Cualitativa. En: A. Quintana & W. Montgomery (eds.), *Psicología: Tópicos de actualidad Primera ed.* (pp. 47–84). https://cienciassociales.webcindario.com/PDF/Cualitativa/Inv_quintana.pdf
- Ramsay, R. (2004). El Maguey en Gundhó, Valle del Mezquital (Hidalgo, México): Variedades, Propagación y Cambios en su Uso. *Etnobiología*, 4(1): 54-66
- Robledo-Márquez, K., Ramírez, V., González-Córdova, A. F., Ramírez-Rodríguez, Y., García-Ortega, L., & Trujillo, J. (2021). Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico. Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food Research International*, 147, 110482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110482>
- Rojas-Rivas, E., Viesca-González, F. C., Favila-Cisneros, H. J., & Cuffia, F. (2019). Consumers' perception of a traditional fermented beverage in Central Mexico: An exploratory study with the case of pulque. *British Food Journal*, 122(2), 708–721. <https://doi.org/10.1108/BFJ-05-2019-0317>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2012). *Agricultura familiar con potencial productivo en México*. FAO- SAGARPA. México, D.F. 537p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). *Atlas Agroalimentario 2012 – 2018*. SAGARPA- SIAP https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018.
- Urbina, C. J. F. (2020). Los gualumbos: Deleite gastronómico del estado de Hidalgo. *Herreriana*, 2(1), 26–29.
- Viniegra-González, G. (2021). Agave bioindustries: history and future of a strategic bioresource. *Energy: Science, Technology and Management*, 1(1): 12-24.

5.3 PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES DEL SISTEMA AGROFORESTAL DEL AGAVE LLAMADO METEPANTLE

Gustavo Viniegra-González^{1*}, Alma Cruz-Guerrero¹, Ernesto Favela-Torres¹, Gilberto Hernández-Cárdenas¹, Nayeli A. Martha-Lucero¹, Eric Sánchez-Ortega², Fernando de León-González³

RESUMEN

El metepantle (*metl*, agave; *pantli*, pared o barrera) es un sistema agroforestal conformado por camellones de milpas u otros cultivos anuales, entre hileras de agaves, principalmente *Agave salmiana*, frecuente en los Valles Altos (Hidalgo y Tlaxcala) y destinado en forma predominante a la producción de pulque y alimentos. La migración, el cambio climático y la transición energética del petróleo abren la posibilidad para que el metepantle se vuelva una estrategia agrícola valiosa para México. Las novedades por introducir para el aprovechamiento de los agaves de los metepantles serían: a corto plazo, los destilados del pulque; a mediano plazo, el uso textil y forrajero del ensilaje de las hojas del agave y, a largo plazo, el uso de la biomasa de esta planta para producir ácido láctico como materia prima para la elaboración de bioplásticos. Estos usos innovadores se sumarían al aporte que hace el cultivo del agave a la economía familiar por la venta de pulque y la conservación de los suelos. Aquí se revisan los datos básicos del metepantle y se presentan los escenarios para su desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Metepantle, economía campesina, biomasa del agave, ácido láctico, escenarios.

¹ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. CDMX
*vini@xanum.uam.

² Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit.

³ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. CDMX

Antecedentes del agave pulquero

La agroforestería con agaves se desarrolló desde hace siglos (Dering, 1999; Trombold & Israde-Alcantara, 2005; Hammerl *et al.*, 2015), pues existen indicios de hace más de 600 años del consumo directo de las hojas de agave (Hammerl *et al.*, 2015) y del pulque (Correa-Ascencio *et al.*, 2014). Este sistema agrícola contribuyó a preservar la biodiversidad, reforzar la identidad cultural (González-Jácome, 2003; Moreno-Calles *et al.*, 2013) y mejorar la productividad agrícola (Smith & Price, 1994; Albino-Garduño *et al.*, 2015). Actualmente es un sistema sostenible utilizado por miles de familias campesinas ubicadas principalmente en los estados de Hidalgo y Tlaxcala que ofrece una plataforma agrícola tradicional susceptible de mejorarse, ya que las adaptaciones de sistemas tradicionales son más aceptables por los campesinos que las propuestas con opciones productivistas tipo “MasAgro” (Turrent-Fernández, 2017). Como los agaves evolucionaron en zonas desérticas (Good-Ávila *et al.*, 2006), adquirieron alta eficiencia en el aprovechamiento del agua, según se indica en el Cuadro 1 (Nobel, 1991). La elevada productividad de *A. tequilana*, bajo condiciones limitantes de agua, ha sido confirmado mediante observaciones agronómicas (Zúñiga-Estrada *et al.*, 2018). Esto explica el uso de los agaves por los pobladores originarios para enfrentar la sequía (Nelson *et al.*, 2012). Por esa razón, en el siglo XXI los agaves parecen ser un recurso valioso para enfrentar al cambio climático (Owen *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Comparación de la productividad de diferentes tipos de plantas, según su metabolismo fotosintético

Metabolismo	kJ/CO ₂	CO ₂ /H ₂ O	Mg/(ha* año)
C ₃	867	0.5 – 1.5	30 - 45
C ₄	665	1.0 – 2.0	32 - 67
CAM	740	4.0 – 10.0	22 - 36

Datos de Nobel (1991).

Ejemplos del tipo de metabolismo.

C₃: Arroz, trigo, soya, tubérculos (papa, yuca), pinos.

C₄: Maíz, caña de azúcar, sorgo, sorgo dulce, pastos.

CAM: Agavácea, Bromeliácea (piña), Cactus (Opuntia).

CAM (Crassulic Acid Metabolism).

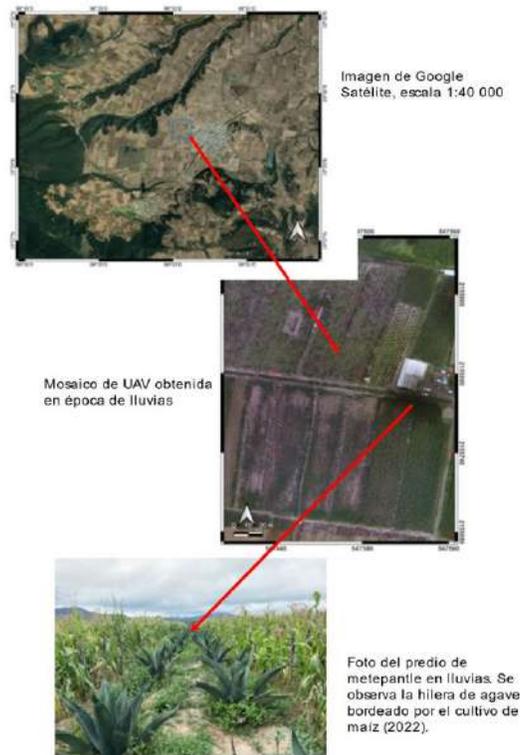


Figura 1. Imágenes de metepantles de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala. La imagen superior fue obtenida de Google Maps; la intermedia, usando un Vehículo Aéreo No Tripulado (*dron*); la inferior, mediante inspección directa en terrenos del Grupo Pulmex. Elaboración de Gilberto Hernández Cárdenas (marzo, 2022).

Los “agaves pulqueros” de los metepantles pertenecen a las especies: *A. salmiana*, *A. atrovirens*, *A. americana* y *A. mapisaga* (Moreno-Calles *et al.*, 2013) y son usados para producir un mosto llamado aguamiel (*nebcutli* en náhuatl), con 10 a 20% de azúcares reductores (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008), cuya fermentación produce la bebida pulque (*octli*). Su ecología microbiana incluye a levaduras y bacterias lácticas (Sánchez-Marroquín & Hope, 1953; Escalante *et al.*, 2004).

Al final del siglo XIX se producían anualmente más de mil millones de litros de pulque en un área de más de 50,000 hectáreas situadas en los estados de Hidalgo, México, Puebla y Tlaxcala (Ramírez-Rodríguez, 2021). A la fecha sólo se producen 150 millones de litros por año en sólo 10,000 hectáreas (Narro-Robles *et al.*, 1992) y representan un volumen inferior al 2% del consumo nacional de la cerveza. Esta superficie de cultivo está compuesta principalmente por la suma de muchas pequeñas parcelas de metepantles porque las zonas de monocultivo o de parcelas mayores de 10 hectáreas son muy poco frecuentes, según se puede apreciar mediante el estudio de imágenes satelitales de las principales regiones pulqueras. En otras palabras, la producción latifundista con el monocultivo del agave pulquero de principios del siglo XX ha sido sustituida por la producción minifundista agroforestal del siglo XXI.

Análisis de los metepantles

1) Ascenso y descenso de la industria pulquera

La historia de la industria pulquera está relacionada con los períodos denominados: Porfiriato, Reforma Agraria y gobiernos posrevolucionarios (Ramírez-Rodríguez, 2018). Su descenso se inició cuando se repartió la tierra de las haciendas sin una estrategia para diversificar y redimensionar la producción del pulque para enfrentar a la emergente industria cervecera. En 1964 Alfredo Sánchez Marroquín construyó en Santa María Tecajete, Hidalgo, una instalación piloto financiada por el Patronato del Maguey (Camacho, 2008) donde estudió la producción de: pulque (Sánchez-Marroquín & Hope, 1953), jarabes de fructosa, bebidas destiladas y ensilaje de agave (Sánchez-Marroquín & Rocha, 1967). Este ambicioso proyecto fue abandonado, pero fue la semilla para la diversificación de esta industria, incluyendo la pasteurización del pulque para su exportación (Ramírez, 2005; Flores-Paredes, 2019). Esos desarrollos son los antecedentes de las siguientes secciones.

2) Análisis económico de los metepantles

Los metepantles son parte de los minifundios agrícolas ocupados por 2.3 millones de familias que cultivan superficies de alrededor de 2 hectáreas por unidad productiva. La producción promedio de maíz en estas unidades es inferior a 2 Mg (toneladas) por hectárea (Turrent-Fernández *et al.*, 2014), la cual, aunque es baja, satisface las necesidades básicas de aminoácidos y energía de una familia de cuatro personas con una dieta sustentada en el maíz y el frijol.

Los datos disponibles de las milpas de Nanacamilpa, Tlaxcala (González-Amaro *et al.*, 2009) y los recabados por Viniegra-González (2021) indican que, a pesar de que los agaves sólo ocupan el 25% del área cultivada de un metepantle tradicional. Empero, el 49% de la biomasa producida (7.6 Mg en base seca) proviene de los agaves. Las arvenses y el rastrojo de maíz proporcionan el 35%. Los granos (maíz y frijol) sólo contribuyen en un 16% del rendimiento total. Esto se puede explicar por la mayor eficiencia de los agaves para la utilización del agua en las zonas de temporal.

El balance financiero de este tipo de metepantle indica que el valor estimado de las ventas de granos (maíz y frijol), las arvenses y pulque es 19 veces mayor que el valor aislado de la producción de maíz. Por lo tanto, desde el punto de vista productivo y comercial, los agaves tienen un valor mucho mayor que la milpa, aunque el valor no monetario de la subsistencia debe ser tomado en cuenta en las decisiones económicas de los campesinos, como se indica en la sección de innovación y transferencia de tecnología.

Por otra parte, las remesas de los migrantes, enviadas en 2022 desde EUA, fueron de 58 mil millones de USD (Fundación BBVA, 2022), los cuales, al dividirse entre 10 o 12 millones de familias, resultan en un ingreso anual cercano a 5 mil USD. Este sería el umbral económico para la migración que resulta imposible alcanzar mediante la venta de los excedentes de granos, pues para obtener 5 mil dólares se necesitaría vender más de 16 Mg de maíz al precio internacional de 300 USD por Mg. Esto ha sido estudiado en la zona de metepantles del Alto Mezquital, Hidalgo (Leyva *et al.*, 2021). En las siguientes secciones se analiza el papel de los agaves como cultivo comercial de los metepantles.

Alternativas comerciales para los metepantles

El trabajo de campo y hemerográfico mostró el interés de los pequeños productores de agave por diversificar el aprovechamiento del pulque y del aguamiel, según se describe a continuación.

1) Destilados del pulque

J. G. Rosáinz-Arroyo de Altzayanca, Tlaxcala, relata que antaño los excedentes ácidos del pulque eran destilados para producir aguardiente. Por eso él instaló un alambique donde produce este licor (Agroorgánico, 2017), ilustrado en la Figura 2. Un alambique similar opera en el Rancho San Isidro de Nanacamilpa, estado de Tlaxcala. Se tiene noticia (Moreno-Gaytán, 2022) de esos destilados en Coatepec (Ixtapaluca) y en Axapusco, Estado de México (Echeverría, 2022). No existen estadísticas de su producción, ni datos de su denominación de origen o norma específica. Sin embargo, los productores indican la importancia de la tecnología de la destilación, controlada por un buen catador (Echeverría, 2022) y estos destilados se mencionan como una diversificación, a corto plazo, del uso del aguamiel.



Figura 2. Alambique de acero inoxidable en el Rancho Los Sauces, Altzayacan, Tlaxcala, para destilar aguardiente del pulque (Cortesía de Eric Ortega Sánchez y J. Ro Sáinz)

2) Concentración o pasteurización del aguamiel

Para aprovechar los excedentes del aguamiel se ha desarrollado la producción artesanal o semiindustrial de jarabes (Roldán-Cruz *et al.*, 2022). El efecto de la temperatura de proceso sobre la calidad del producto ha sido evaluado (González-Montemayor *et al.*, 2020) y se han desarrollado modelos y análisis económicos del proceso (Rojas-Rojas *et al.*, 2021; Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2018; Viaña-Cabrera, 2014). La experiencia de campo ha mostrado tres problemas: atraso en la tecnología de evaporación, conflictos en la organización de las empresas comunitarias o familiares y limitaciones comerciales para competir con los jarabes de *A. tequilana*. Se requiere resolver dichos problemas para el desarrollo de esta alternativa, según se discute en la sección de innovación y transferencia de tecnología de este escrito.

La pasteurización por medio de ultrafiltración (Palafox-González, 2017; Castro-Díaz, 2014), ozonización (Corona-Pérez, 2021) o calentamiento (Chagua-Rodríguez *et al.*, 2020) han sido estudiadas en el laboratorio. Los resultados mostraron un alargamiento a 20 días para el almacenamiento del aguamiel; sin embargo, no se tiene noticia de un escalamiento comercial de esta alternativa.

3) Producción de fibra (ixtle) y forrajes de las hojas de *A. salmiana*

En el manejo tradicional del metepantle, después de la producción de aguamiel, las hojas verdes quedan como residuos; a las hojas viejas, utilizadas como combustibles, se les llama mezotes. Cada roseta (Figura 3) de una planta madura de agave suele tener 20 a 30 hojas con pesos de 10 a 15 kg cada una. Las hojas frescas pueden picarse para ser usadas como forraje ensilado (Figura 4) o se pueden raspar para separar la fibra de la pulpa (Figura 5). En el Cuadro 2 se indica que el aprovechamiento integral de las hojas duplica el valor de las ventas de los metepantles y seguramente servirá como estrategia de mediano plazo para mejorar la economía de los metepantles.



Figura 3. Roseta de hojas de una planta de *Agave salmiana*



Figura 4. Pesebre con hojas picadas y ensiladas de *A. salmiana* (Cortesía de S. Acosta, Nanacamilpa de Mariano Arista, 2022)



Figura 5. Pulpa (izquierda) y fibra (derecha) obtenidas por el raspado mecánico de las hojas de *A. salmiana* (Cortesía de F. Cortés-Bárceñas, febrero 2021)

Cuadro 2. Balance anual de materiales y ventas de una hectárea de metepantle*

Rubro	kg/planta	Plantas cosechadas	Pecio Unitario USD/kg	Valor USD/año
1. Aguamiel	400 L	25	0.25 – 0.50	2,500 – 5,000
2. Pencas (20% MS)	200 - 450	25	0.05 – 0.10	250 – 1,125
3. Ixtle (20% MS)	40 – 90	25	1 - 2	1,000 – 4,500
4. Pulpa (80% MS)	160 - 360	25	0.25	1,000 – 2,250
5. Ovinos (11/1)	14.5 – 32.7	25	2.0 – 2.5	725 – 2,043
Sumas (1 + 3 + 5)				4,225 – 11,543

*250 plantas con 10 años de maduración. Las rosetas de las plantas de agave se conforman de 20 a 30 hojas, cada una de 10 kg a 15 kg. Una planta madura de *A. salmiana* pesa de 800 kg a 1,000 kg con 20% de MS. No se incluyen la biomasa de las raíces, los tallos y hojas viejas (*mezotes*) ni la piña hueca (*mezontete*) que son cerca del 50% de la masa total. La producción ovina incluye: preñez, destete y engorda y la conversión (11/1) es el promedio de todo el ciclo.

4) Producción de ácido láctico de la biomasa de *A. salmiana*

En la Figura 6 se confirma la producción de ácido láctico por la fermentación de los fructanos en los ensilajes de agave y en medios químicamente definidos. Este ácido es la materia prima para la producción sustentable del ácido poli láctico, principal bioplástico biode-

gradable, cuya demanda proyectada para 2021 se acerca al millón de toneladas (European Bioplastics, 2017). Por lo tanto, los metepantles del futuro tendrían un nuevo mercado que abarcaría cientos de miles de hectáreas con empleo sostenible para muchos campesinos y contribuiría a la transición energética por la reducción de la producción y consumo de los plásticos petrolíferos.

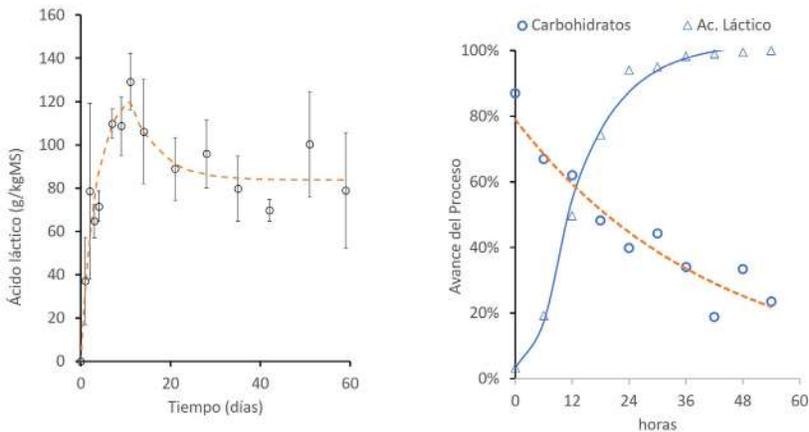


Figura 6. A la izquierda, la producción de ácido láctico durante el ensilaje de la pulpa de *A. salmiana* sin aditivos, cada medición por triplicado. A la derecha, la producción de ácido láctico a partir de fructanos industriales (10 g/L), enriquecidos con hidrolizados de soya (C/N = 2.5) e inoculados con *L. casei*. El rendimiento fue del 80% en función de los fructanos consumidos. Los fructanos fueron elaborados por Nutriagaves y proporcionados por la Dra. Rosa Ma. Camacho del CIATEJ.

Escenarios para el metepantle

Los resultados aquí mostrados indican tres escenarios consecutivos que favorecen la consolidación y ampliación de los metepantles: a) A corto plazo, la consolidación de la producción de pulque por el aprovechamiento de sus excedentes, mediante la producción de licores destilados y jarabes concentrados, b) A mediano plazo, el desarrollo de la plataforma forrajera y textil, a partir de las hojas (pencas) residuales de la producción de pulque y c) A largo plazo, el desarrollo de la plataforma industrial del ácido poli láctico a partir de la biomasa

de los agaves. De esa manera, los metepantles diversificados podrían crear empleos sostenibles, mitigarían la migración, serían una estrategia para enfrentar el cambio climático y contribuirían a la transición de una economía basada en el petróleo hacia una bioeconomía circular.

La iniciativa forrajera a través del ensilaje de las hojas del agave, estudiada por Sánchez-Marroquín & Rocha (1967), es fácil de llevar a cabo, pues sólo requiere de máquinas picadoras de bajo costo que se producen localmente. Su mercado principal es la cría y engorda de ovinos (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2006) destinados a la producción de la carne horneada llamada “barbacoa”, cuya demanda ha crecido en forma sostenida durante los últimos 20 años y aún requiere la importación de carne congelada (CIBO, 2013). Con esta alternativa se ampliaría la oferta de ovinos sin que se necesite un aumento de la tierra cultivada, pues las hojas del agave son un subproducto de la producción de pulque, el tequila o el mezcal. Por ello, ya se está divulgando de forma espontánea entre los productores de agave, incluyendo los que usan los metepantles. Los estudios de Herrera *et al.* (1980) mostraron que el residuo ensilado de *A. sisaliana*, químicamente similar a los residuos de otros agaves, es un forraje efectivo para la engorda de rumiantes. Los estudios en marcha en el COLPOS (Mario A. Cobos, inédito) están orientados a evaluar a este ensilaje como sustituto de otros forrajes en la producción de leche.

Por otra parte, la fibra del agave está siendo revalorada a escala mundial y local porque permite elaborar bolsas y otros productos de uso masivo que son biodegradables y pueden reducir significativamente la contaminación generada por los productos de polietileno o polipropileno de muy lenta o nula biodegradación. En la Ciudad de México se prohibió el uso de las bolsas de plástico de un solo uso (SEDEMA, CDMX, 2021), incluyendo las bolsas de polietileno usadas en el acarreo familiar de los alimentos; esta disposición abrió el mercado para bolsas reusables y biodegradables con un potencial de más de 10,000 toneladas de bolsas de ixtle y las cadenas de valor de este ramo son fáciles de construir porque sólo necesitan de raspadoras rurales de las hojas, telares (artesanales o industriales) y talleres de costura. Las experiencias de campo han demostrado

que es factible producir y vender estos artículos a buen precio y su valor económico es el doble del valor final del mercado del forraje convertido en barbacoa. El factor limitante es la escasa oferta de maquinaria de raspado para las hojas de *A. salmiana*, que son mucho más gruesas que las hojas de otros agaves comerciales. La figura 5 muestra la operación de una nueva máquina raspadora de pequeña escala, aunque ya está en marcha el diseño y construcción de máquinas raspadoras de escala comercial para las hojas de *A. salmiana*. De modo que el uso combinado, forrajero y textil de las hojas de *A. salmiana* ampliarán el mercado de los derivados de este agave y la cosecha de esta planta como biomasa seguramente enriquecerá la demanda de los productos generados por los metepantles.

Los plásticos biodegradables, principalmente los producidos a partir de los ácidos láctico y poli hidroxibutírico, tienen como factor limitante la disponibilidad de sustratos fermentables baratos. En EUA, la empresa Cargill desarrolló en 1989, en Nebraska, una fábrica para la producción de 150 mil toneladas de polilactato, usando como sustrato a la glucosa derivada del almidón de maíz (NatureWorks, 2019); fábricas similares se han construido en Europa y Asia (European Bioplastics, 2017). Para México esta estrategia no es factible por el déficit crónico de maíz que haría inviable la producción de ácido láctico derivado del almidón. Pero, como es factible la producción de ácido láctico a partir de los fructanos de agave (Figura 6), se puede considerar a la producción de biomasa de *A. salmiana* (y otros agaves) como fuente barata de sustrato para este fin. En dicho caso, la biomasa del agave entero estaría destinada a la producción de jugo o savia de agave y la fibra sería un subproducto de estas fábricas. Los difusores para la extracción líquida de los fructanos ya funcionan en las industrias del tequila y de las agavinas (*inulina* del maguey), pero falta el desarrollo de los reactores de fermentación y de recuperación del ácido láctico como materia prima intermedia para la elaboración del ácido poliláctico. Esta es la nueva frontera para el desarrollo de las biorrefinerías de los agaves.

Innovación y transferencia de tecnología en las comunidades rurales

Las comunidades rurales generalmente están sujetas a relaciones de dominación y explotación por el intercambio desigual entre el sistema comercial moderno y el sistema productivo tradicional. Para analizar este problema Chayanov (1966) propuso la existencia de tres fondos de las finanzas domésticas tradicionales: a) Subsistencia; b) Solidaridad comunitaria y c) Intercambio comercial.

Con el primer fondo se establecen los balances prácticos de bienes y servicios evaluados según su valor de uso, como son los alimentos y los productos artesanales de utilización inmediata. Para una familia de cuatro personas esto significa la necesidad de contar con una o dos toneladas de granos, principalmente maíz y frijol, que les permita satisfacer sus necesidades nutricionales mínimas.

Con el segundo fondo se establecen los intercambios de bienes y servicios que consolidan las relaciones comunitarias. Ahí se establecen las obligaciones de trabajo comunitario o tequio y la celebración de fiestas donde se comparten alimentos y espectáculos, a través de los sistemas de mayordomía.

Estos dos fondos no se rigen por las leyes de la oferta y la demanda ni por balances financieros de rentabilidad, propios de las empresas mercantiles. Por ejemplo: el valor de contar con alimentos o de alcanzar el prestigio de la mayordomía no se mide por el valor comercial de los productos o de las horas de trabajo empleadas. Se mide en función de las necesidades de supervivencia, tanto familiar como comunitaria. El análisis y funcionamiento de estos dos fondos, no monetizados, de los metepantles, han sido el objeto de estudios antropológicos y botánicos (Matías-Mondragón, 2022).

Con el tercer fondo se establece la necesidad de obtener ingresos monetarios suficientes para pagar bienes y servicios relacionados con la vida moderna. Por ejemplo: el pago de servicios financieros, asistencia médica, pasajes, ropa y bienes duraderos, incluyendo los domésticos y los de comunicación. El monto mínimo de este fondo se puede estimar en 100 mil pesos anuales, por dos caminos: el valor promedio de las remesas de los migrantes o de los salarios del medio

urbano. Este monto correspondería a un ingreso neto de 1.323 salarios mínimos. Como una elevada proporción de los campesinos no tienen esos ingresos, recurren a la migración a las ciudades o EUA para resolver este problema (Leyva *et al.*, 2021).

Para ilustrar la importancia de los productos con alto valor agregado, se puede estimar que para obtener 100 mil pesos por la venta de maíz se requieren, como ya se indicó, la venta de más de 16 toneladas, lo cual sería una meta imposible de lograr en un minifundio. Pero por la venta de pulque, sólo se requieren 10 o 20 mil litros, cuyo nivel de producción es común en las parcelas campesinas. Este somero análisis de las finanzas campesinas indica la importancia para esas familias de contar con productos, como el pulque, que puedan aportar dichos ingresos por su venta. En otras palabras, los agaves pulqueros no solamente cumplen un papel ecológico de retención del suelo y son las barreras de los cultivos tradicionales, son un recurso que permite obtener ingresos que serían imposibles de alcanzar por la venta de los granos o de los derivados de los productos anuales de las parcelas.

Como el mercado del pulque se ha estancado durante los últimos 40 años, los campesinos han estado buscando productos alternativos para transformar el aguamiel o los derivados de las hojas. Un producto que ha resultado interesante es el jarabe concentrado, pero los grupos interesados en Hidalgo y Tlaxcala no han podido entrar al mercado por tres razones: a) La tecnología tradicional de evaporación consume demasiada mano de obra y combustible, b) El mercado urbano y de exportación de las mieles de agave es muy competitivo por la producción de mieles de *A. tequilana* y c) Las formas tradicionales de tipo familiar no son, necesariamente, compatibles con las formas de organización agroindustrial.

Por lo tanto, el desarrollo de productos alternativos del agave pulquero requiere un enfoque que resuelva esos tres problemas. Un camino para lograrlo es el desarrollo de innovaciones, tanto técnicas como sociales, adecuadas a la vida rural. Por ejemplo: a) La adaptación o innovación del equipo de procesamiento, el cual, siendo eficiente, sea adecuado en escala, costo y modo de operación a las condiciones de las pequeñas empresas rurales. b) El establecimiento de acuerdos

o negociaciones con organizaciones de consumidores interesados en pagar el precio justo, a cambio de una reducción de los costos del consumo por la eliminación de intermediarios o de la promoción y consumo de productos ecológicamente adecuados. c) La promoción de organizaciones de productores mediante el ajuste de las nuevas formas de producción a las condiciones sociales y culturales de cada comunidad.

Un ejemplo de este tipo de desarrollo alternativo para la comercialización de productos de alto valor es la UCIRI (Unión de Comunidades Indígenas de la Región del Istmo) analizada por Jurado-Celis y Bartra-Vergés (2013). Esta asociación ha resuelto los problemas antes descritos por medio de alianzas con grupos de consumidores europeos interesados en el mercado del precio justo del café (fair trade) y una sólida organización comunal capacitada y certificada para la producción de café orgánico de exportación. Algunas experiencias piloto para la comercialización de las artesanías del ixtle proveniente del Alto Mezquital sugieren que el ejemplo de la UCIRI, adaptado a las condiciones de los campesinos con metepantles, es el camino para desarrollar la producción y comercialización alternativa de los derivados del agave pulquero.

Conclusión

Todo lo anterior indica que el sistema agrícola del metepantle no sólo es un patrimonio cultural de México, también puede convertirse en una nueva fuente de riqueza para una gran parte de los campesinos de las regiones semi áridas del país y en un recurso renovable para enfrentar el cambio climático y la transición de una economía basada en el petróleo a una basada en los recursos renovables.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por la UAM, por el proyecto “Ensilaje de la pulpa (*gnishe*) de pencas de agave” FORDECYT/24SE/2020/09(30-03) de CONACYT y por Incubaempresas A.C.

Se agradece la colaboración de los propietarios de los Ranchos: “Los Sauces” de Alzayanca, así como: “San Isidro” y “PULMEX”, de Nacamilpa, del estado de Tlaxcala. También se agradece la hospitalidad de la cooperativa “Productores de agave del Alto Mezquital”, del El Cardonal, estado de Hidalgo. Se tuvo el apoyo técnico de Akari Ramírez-López y Sarahí Lissette Alcantar-Morales, becarias del referido proyecto. Se agradecen los consejos técnicos de los doctores María Mayra de la Torre Martínez del CIAD, Hidalgo y Mario A. Cobos, del COLPOS. GVG reconoce la inspiración, orientación personal y ejemplo de don Alfredo Sánchez-Marroquín (1910-2000).

Referencias

- Albino-Garduño, R., Turrent-Fernández, A., Cortés-Flores, J. I., LIVERA-Muñoz, M., & Mendoza-Castillo, M. C. (2015). Root distribution and solar radiation in maize-bean intercropping systems. *Agrociencia*, 49(5), 513-531. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1162/1162>
- Camacho C. (2008). Intentan dar un nuevo auge a la producción de maguey en Hidalgo. *La Jornada*. <https://www.jornada.com.mx/2008/02/25/index.php?section=estados&article=039n1est>.
- Castro-Díaz, A. S. (2014). *Tratamiento del aguamiel mediante ultrafiltración y luz ultravioleta para aumentar su vida de anaquel* [tesis de maestría, Universidad de las Américas]. Repositorio UA. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/castro_diaz_as/
- Chagua-Rodríguez, P., Malpartida-Yapias, R. J., & Ruíz-Rodríguez, A. (2020). Tiempo de pasteurización y su respuesta en las características químicas y de capacidad antioxidante de aguamiel de Agave americana L. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 45-57. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.532>
- CIBO - Congreso Internacional del Borrego (2013). Buenas perspectivas para los precios de ovinos en todo el mundo ante la falta de oferta. *IV Congreso Internacional del Borrego. La revista del Borrego* [Resumen de una conferencia] http://borrego.com.mx/CIBO2013/docs/Mercado_mundial_del_cordero_y_perspectivas_para_Mexico.pdf.

- Corona-Pérez, A. C. (2021). *Ozonización para la estabilidad microbiológica, calidad fisicoquímica y nutracéutica de aguamiel de Agave salmiana* [tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo]. Repositorio UAC. <https://hdl.handle.net/20.500.12098/1119>
- Correa-Ascencio, M., Robertson, I. G., Cabrera-Cortés, O., Cabrera-Castro, R., & Evershed, R. P. (2014). Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(39), 14223-14228. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408339111>.
- Chayanov, A. V. (1966). On the theory of non-capitalist economic systems. *The theory of peasant economy*, 1-28. https://www.ciesas.edu.mx/publicaciones/clasicos/Articulos_CCA/035_CHAYANOV_On_the_theory.pdf
- Dering, P. (1999). Earth-oven plant processing in Archaic period economies: An example from a semi-arid savannah in South-Central North America. *American Antiquity*, 64(4), 659-674. <https://doi.org/10.2307/2694211>.
- Echeverría, M. (2022). ¿Un destilado de pulque? Esta es la estrategia para reposicionar la bebida. *Expansión*. <https://expansion.mx/empresas/2022/03/25/un-destilado-de-pulque-esta-es-la-estrategia-para-reposicionar-la-bebida>
- Empresa familiar busca exportar destilado de pulque. (2017). *AgroOrgánico*. <https://www.agroorganico.info/empresa-familiar-busca-exportar-destilado-pulque/>
- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273-279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09599.x>
- European Bioplastics. (2017). *Bioplastic market data 2016*. https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_Bioplastics_market_data_report_2016.pdf
- Flores-Paredes, J. F. (2019) Resiliencia cultural agroalimentaria vs. expansión del mercado: El caso del maíz y maguey pulquero

- frente a la cebada en el Altiplano Central de México. *Revista Universitaria Digital de Ciencias Sociales. (RUDICS)*, 10(19), 61-79. <https://virtual.cuautitlan.unam.mx/rudics/?p=2777>
- Fundación BBVA. (2022). *Anuario de migración y remesas México 2022*. https://www.bbvaesearch.com/wpcontent/uploads/2022/09/Anuario_Migracion_y_Remesas_2022.pdf
- González-Montemayor, Á. M., Flores-Gallegos, A. C., Serrato-Villegas, L. E., Ruelas-Chacón, X., López, M. G., & Rodríguez-Herrera, R. (2020). Processing temperature effect on the chemical content of concentrated aguamiel syrups obtained from two different Agave species. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1733-1743. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00421-4>
- González-Jácome, A. (2003). *Cultura y agricultura: transformaciones en el agro mexicano*. Universidad Iberoamericana.
- Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9124-9129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103>.
- Hammerl, E. E., Baier, M. A., & Reinhard, K. J. (2015). Agave chewing and dental wear: evidence from quids. *PLoS One*, 10(7), e0133710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133710>
- Herrera, F., Wyllie, D., & Preston, T. R. (1980). Fattening steers on a basal diet of ensiled sisal pulp and molasses/urea supplemented with sunflower meal and Leucaena forage. *Tropical Animal Production*, 5(1), 18-24. https://cipav.org.co/TAP/TAP/TAP51/5_1_4.pdf
- Jurado-Celis, S., & Bartra-Vergés, A. (2013). Cómo sobrevivir el mercado sin dejar de ser campesino. El caso de los pequeños productores de café en México. Veredas. *Revista del Pensamiento Sociológico, (Especial/2)*, 181-191. UAM Xochimilco.
- Leyva, D., De la Torre, M., & Coronado, Y. (2021). Sustainability of the Agricultural Systems of Indigenous People in Hidalgo, Mexico. *Sustainability*, 13(14), 8075. <https://doi.org/10.3390/su13148075>
- Matías-Mondragón, M. E. (2022). *Caracterización del metepantle, un sistema agrícola tradicional del ejido El Rosario, Tlaxco-Tlaxcala, México* [tesis de

maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2022/febrero/0822608/Index.html>

- Moreno-Calles, A. I., Toledo, V. M., & Casas, A. (2013). Agroforestry systems of Mexico: A biocultural approach. *Botanical Sciences*, *91*(4), 375-398. <https://doi.org/10.17129/botsci.419>
- Moreno-Gaytán, S. I. (2022). Sistemas agroalimentarios periurbanos: relaciones de proximidad rural-urbano en Coatepec, Ixtapaluca, México. *Economía, sociedad y territorio*, *22*(68), 117-145. <https://doi.org/10.22136/est20221669>
- Narro-Robles, J., Gutiérrez-Ávila, J. H., López-Cervantes, M., Borges, G., & Rosovsky, H. (1992). La mortalidad por cirrosis hepática en México II. Exceso de mortalidad y consumo de pulque. *Salud Pública de México*, *34*(4), 388-405. <https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5517/5898>
- NatureWorks. (2019). *About NatureWorks*. <https://www.natureworkslc.com/About-NatureWorks#:~:text=What%20began%20in%201989%20as,which%20we%20are%20known%20today>
- Nelson, M. C., Hegmon, M., Kintigh, K. W., Kinzig, A. P., Nelson, B. A., Anderies, J. M., & Meegan, C. (2012). Long-term vulnerability and resilience: three examples from archaeological study in the southwestern United States and northern Mexico. En *Surviving sudden environmental change: Answers from archaeology* (pp.197-221). University Press of Colorado
- Nobel, P. S. (1991). Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C3 and C4 plants. *New Phytologist*, *119*(2), 183-205. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb01022.x>
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., & Belleville, M. P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(10), 3682-3687. <https://doi.org/10.1021/jf072767h>
- Owen, N. A., Fahy, K. F., & Griffiths, H. (2016). Crassulacean acid metabolism (CAM) offers sustainable bioenergy production and

- resilience to climate change. *GCB Bioenergy*, 8(4), 737-749. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12272>
- Palafox-González, L. (2017). *Desarrollo de alternativas de consumo de productos de maguey mediante la microfiltración de aguamiel y pulque de los estados de Puebla y Tlaxcala* [tesina de maestría, Colegio de Postgraduados]. Repositorio institucional COLPOS. <http://hdl.handle.net/10521/3799>
- Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., García-López, J. C., Rivera-Miranda, M. T., González-Muñoz, S., López-Aguirre, S., & Chávez-Villalobos, D. (2006). Use of “Maguey” (*Agave salmiana* Otto ex. Salm-Dick) as forage for ewes. *Journal of Applied Animal Research*, 30(2), 101-107. <https://doi.org/10.1080/09712119.2006.9706596>.
- Ramírez, D. A. S. (2005). *Plan de exportación de pulque enlatado marca “Néctar del Razo” a Vancouver, BC*. Universidad de las Américas.
- Ramírez-Rodríguez, R. (2018). *La querrela por el pulque: auge y ocaso de una industria mexicana, 1890-1930*. El Colegio de Michoacán. Michoacán. <https://doi.org/10.32991/2237-2717.2021v11i2.p397-431>
- Ramírez-Rodríguez, R. (2021). El Cambio de la Actividad Agrícola en los Llanos de Apan: el Caso del Cultivo del Maguey en el Siglo XX. *Historia Ambiental Latinoamericana y Caribeña (HALAC)*. *Revista de la Solcha*, 11(2), 397-431. <https://doi.org/10.32991/2237-2717.2021v11i2.p397-431>
- Roldán-Cruz, E. I., Chavarría-Miranda, H., & Cano de la Rosa, J. (2022). Intervenciones programáticas y bioeconomía: repensar la viabilidad del maguey. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(1), 167-179. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i1.2334>.
- Rojas-Rojas, M. M., Valencia-Sandoval, K., Ybarra-Moncada, M. C., & Brambila-Paz, J. J. (2021). Competitiveness and innovation in the pulquera industry, an economic analysis. *Nova scientia*, 13(26), 00015. <https://doi.org/10.21640/ns.v13i26.2810>
- Sánchez-Marroquín, A., & Hope, P. H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(3), 246-249. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf60003a007>

- Sánchez- Marroquín, A., & Rocha, M. D. C. (1967). Chemical characterization of silages of maguey (*Agave atrovirens* var. Karw.). *Ciencia*, 25, 169-172.
- Secretaría del Medio Ambiente-Gobierno de la Ciudad de México. (2021). *Prohibición de plásticos de un sólo uso*. http://www.data.sedema.cdmx.gob.mx:8081/culturaambiental/images/Prohibicion_plasticos_desechables_presentacion_ventana_informativa.pdf
- Smith, M. E., & Jeffrey Price, T. (1994). Aztec-Period Agricultural Terraces in Morelos, Mexico: Evidence for Household level agricultural Intensification. *Journal of Field Archaeology*, 21(2), 169-179. <https://doi.org/10.2307/529863>
- Trombold, C. D., & Israde-Alcantara, I. (2005). Paleoenvironment and plant cultivation on terraces at La Quemada, Zacatecas, Mexico: the pollen, phytolith and diatom evidence. *Journal of Archaeological Science*, 32(3), 341-353. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2004.10.005>
- Turrent-Fernández, A., Espinosa Calderón, A., Cortés Flores, J. I., & Mejía Andrade, H. (2014). Análisis de la estrategia MasAgro-maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1531-1547. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v5n8/v5n8a16.pdf>
- Turrent-Fernández, A., Cortés Flores, J. I., Espinosa Calderón, A., Hernández Romero, E., Camas Gómez, R., Torres Zambraño, J. P., & Zambada Martínez, A. (2017). MasAgro or MIAF, which one is the best option to sustainably modernize traditional agriculture in Mexico? *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(5), 1169-1185. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.116>
- Viaña-Cabrera, L. (2014). *Utilización del subproducto del pulque para la elaboración de miel de maguey: formulación y evaluación del proyecto* [tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Apizaco].
- Villavicencio-Gutiérrez, M., Ernesto Martínez-Castaneda, F., & Roberto Martínez-Campos, A. (2018). Financial evaluation of Maguey pulquero products portfolio in Mexico's central highlands. *Journal of Agriculture and Environment for International Development*, 112(2), 361-379. DOI: 10.12895/jaeid.20182.826
- Viniegra-González, G. (2021). Agave bioindustries: history and future of a strategic bioresource. *Energy: Science, Technology, and Mana-*

gement, 1(1). <https://amexen.org/energy/index.php/energy/article/view/13/31>

Zúñiga-Estrada, L., Rosales Robles, E., Yáñez-Morales, M. D. J., & Jacques-Hernández, C. (2018). Características y productividad de una planta MAC, Agave tequilana desarrollada con fertigación en Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3), 553-564. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.1214>





CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Los agaves han sido aprovechados desde tiempos ancestrales para la producción de bienes; se obtiene de ellos comida, bebida, vestido y sustento. Sin embargo, es imperante promover el aprovechamiento sostenible de este bien y del patrimonio inmaterial asociado a su manejo. Este libro documenta la biología de los agaves, su reproducción, composición bioquímica, su aprovechamiento para producir bebidas, fructanos, saponinas y el aprovechamiento de residuos. En esta obra se hace especial énfasis en el manejo agroforestal y en estrategias para la conservación de la diversidad de esta planta. Se evidencia la riqueza cultural entorno a los agaves y la importancia de la conservación de dicho patrimonio.