



INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

Proyecto:

**“CORRELACIÓN ENTRE EL DAÑO POR MANCHA DE ASFALTO EN EL MAÍZ, Y LA
CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA PLANTA COMO MECANISMO
DE DEFENSA”**

Empresa:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRÍCOLAS Y
PECUARIAS- OCOZOCOAUTLA**

Carrera:

INGENIERIA BIOQUÍMICA

Presenta:

Eunice Patricio Arismendi

Asesor Externo

Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramírez

Asesor Interno

Dra. Rocío Meza Gordillo

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
JUSTIFICACIÓN	6
OBJETIVOS	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ.....	7
Misión.....	7
Visión.....	7
PROBLEMAS A RESOLVER.....	10
ALCANCES Y LIMITACIONES.....	11
Alcances.....	11
Limitaciones	11
ANTECEDENTES	12
IMPORTANCIA DEL MAIZ EN MÉXICO	12
Clasificación del maíz	13
Genotipos de maíz.....	14
DK-357	14
Criollos.....	14
MORFOLOGÍA DE LA PLANTA DE MAIZ	14
Características generales de la planta.....	16
COMPLEJO MANCHA DE ASFALTO	17
<i>Phyllachora maydis</i>	17
<i>Monographella maydis</i>	18
Escala del daño provocado por el CMA.....	19
METABOLITOS SECUNDARIOS.....	21
Fenoles	22
Propiedad antioxidante y antirradical de los compuestos fenólicos	23
Ruta del ácido shikímico.....	24
Fenoles en otras especies vegetales	25
Fenoles en maíz.....	26

MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU	26
METODOLOGÍA.....	27
Inoculación en campo	27
Inoculación en cámara húmeda	27
Material vegetal	28
Selección y recolección de muestras.	28
Obtención de extractos metanólicos	30
Extracción de fenoles totales	30
Realización de la curva patrón	30
RESULTADOS	30
Curva patrón.....	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....	34
ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Campo experimental INIFAP	9
Figura 2 Laboratorio de sanidad vegetal.....	9
Figura 3 Planta de maíz	16
Figura 4 <i>Phyllachora maydis</i> vista al microscopio.....	18
Figura 5 <i>Monographella maydis</i> vista al microscopio	19
Figura 6 <i>Microdochium maydis</i> vista al microscopio.....	19
Figura 7 Estructura química del fenol	23
Figura 8 Ruta del ácido Shikímico.....	25
Figura 9 Parcela con genotipos híbridos	29
Figura 10 parcela con genotipos criollos.....	29
Figura 12 curva patrón de ácido gálico (mg de ác. Gálico/g)	31

Tabla 1 Variedades y usos del maíz.....	13
Tabla 2 Taxonomía <i>P. maydis</i>	17
Tabla 3 Taxonomía <i>M. maydis</i>	18
Tabla 4 Escala de severidad para el CMA.....	20
Tabla 5 Comparación de concentraciones	31
Tabla 6 Análisis estadístico.....	32
Tabla 7 Valores para la curva patrón	39
Tabla 8 Concentración en mg de ac. gálico /g de muestra	40

INTRODUCCIÓN

El complejo mancha de asfalto (CMA) es una enfermedad importante en el país por su efecto negativo en la producción de maíz, México ocupa el lugar número 5 a nivel mundial en cuanto a la producción de este grano. La mancha de asfalto es la enfermedad que más ataca a los cultivos de maíz, ésta se presenta antes de la floración, por lo que es importante evitar la presencia de esta enfermedad ya que puede generar pérdidas severas.

Actualmente la calidad e inocuidad del grano ha ido en aumento por lo que la contaminación de la planta y de los granos es indeseable para los productores, el destino de los granos depende de las características físicas como tamaño, peso y dureza, además de las características químicas, en los estados como Chiapas, Oaxaca y Michoacán, su principal destino es la elaboración de tortillas utilizando principalmente maíz nativo o criollo (Mauricio *et al.*, 2004).

En el estado de Chiapas las semillas utilizadas para el cultivo de maíz provienen de genotipos híbridos comerciales, lo que garantiza a los productores resistencia a sequía o resistencia a enfermedades. Existen pequeñas cantidades de cultivo con genotipos criollos, estos permiten que el productor pueda guardar semillas para las siguientes siembras, caso contrario en genotipos híbridos que las semillas no pueden ser almacenadas y posteriormente sembradas

Las plantas destinan una gran cantidad del carbono que ingieren en la síntesis de compuestos orgánicos, llamados también metabolitos secundarios, cuando los metabolitos sintetizados contienen un grupo fenol estos reciben el nombre de compuestos fenólicos. Se ha reconocido su efecto protector contra diversas plagas en campo y en almacén (Ventura, 2004). Dichas metabolitos se han estudiado en los granos de maíz, no existen reportes en los que se evalúen las concentraciones de fenoles en hojas enfermas por algún tipo de plaga, por lo que en este proyecto, se buscaron genotipos híbridos comerciales que presentaran síntomas del CMA para evaluar las concentraciones de fenoles en las hojas; de la misma manera se identificó

maíz criollo o nativo, con el fin de realizar una comparación entre las concentraciones de fenoles en los dos genotipos de maíz cuando estos estaban sanos y cuando estaban enfermos por el complejo mancha de asfalto.

JUSTIFICACIÓN

La importancia del maíz radica en su uso como alimento en nuestro país y como producto de exportación, sembrándose anualmente 7, 963,450 Ha (SIAP, 2012). Las pérdidas ocasionadas por las diferentes plagas y enfermedades provocan una disminución en el rendimiento de este grano. En 2012 se observó la incidencia del CMA en Oaxaca, con una pérdida del rendimiento mayor al 80 %. Esta enfermedad no solo tiene importancia económica en México ya que se tienen reportes de su presencia en países latinoamericanos (López, 2011).

Cuando las condiciones favorecen la aparición de la mancha de asfalto, las plantas muy susceptibles a enfermarse tienden a secarse en un periodo de 8-14 días, ocasionando grandes pérdidas en el rendimiento de los cultivos.

Se han estudiado las diferentes plagas y hongos que afectan a los cultivos de maíz, tal es el caso del Complejo Mancha de Asfalto identificándose los hongos que intervienen en el secamiento de la planta, pero aún se desconoce si existe una respuesta bioquímica cuando se presenta la infección. Existen reportes de plantas con altas concentraciones de fenoles inducidos por un patógeno, los primeros reportes mostraron la resistencia de la papa a la infección por *Phytophthora infestans*. Existen reportes de la presencia de fenoles en plantas de café (Guedes *et al.* 1994) y plantas de tabaco (Alcántar, 2005), por lo que encontrar respuesta bioquímica en las plantas de maíz serviría para aumentar la información y encontrar soluciones a enfermedades que afectan estos cultivos.

OBJETIVOS

Determinar la concentración de compuestos fenólicos en plantas de maíz durante la infección por mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extraer fenoles libres y totales de plantas de maíz utilizando metanol como disolvente.

Cuantificar la concentración de compuestos fenólicos en extractos metanólicos en plantas de maíz a diferentes etapas de infección por mancha de asfalto.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

El presente trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en el Laboratorio de Sanidad Vegetal, ubicado en la ciudad de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas. La cuantificación de fenoles totales se realizó en los laboratorios del Polo Tecnológico en Biocombustibles del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. A continuación se menciona la misión, visión, localización y objetivos del INIFAP.

Misión

Contribuir al desarrollo productivo, competitivo, equitativo y sustentable de las cadenas agropecuarias y forestales, mediante la generación y adaptación de conocimientos científicos e innovaciones tecnológicas y la formación de recursos humanos para atender las demandas y necesidades en beneficios del sector y la sociedad de un marco de cooperación institucional con organizaciones públicas y privadas.

Visión

Institución de excelencia científica y tecnológicas, dotada de personal altamente capacitado y motivado; con infraestructura, herramientas de vanguardias y administración moderna y autónoma, con liderazgo y reconocimiento nacional e internacional por su alta capacidad de respuestas a las demandas de conocimiento e

innovación y formación de recursos humanos en beneficio del sector forestal, agrícola, pecuario y de la sociedad. Objetivos.

1.- Generar conocimiento e innovaciones tecnológicas que contribuyan al desarrollo sustentable de las cadenas agroindustriales forestales, agrícolas y pecuarias del país. En su desempeño busca el aprovechamiento racional y la conservación de los recursos naturales.

2.- Desarrollar y promover investigaciones estratégicas y de fronteras para contribuir oportunamente a la solución de los grandes problemas de productividad, competitividad, sustentabilidad y equidad del sector forestal, agrícola y pecuario del país.

3.- Promover y apoyar la transferencia de conocimiento y tecnologías forestales, agrícolas y pecuarias, de acuerdo a las necesidades y demandas prioritarias de los productores y de la sociedad, así como contribuir a la formación de recursos humanos.

4.- Fortalecer la capacidad institucional a través de la actualización, renovación y motivación de su personal, así como la modernización de las infraestructuras, procedimientos y administración, para satisfacer las demandas de la sociedad.

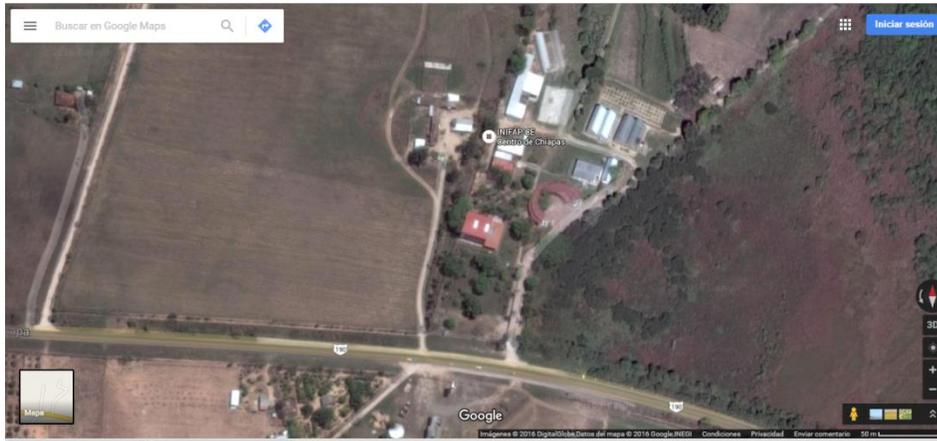


Figura 1 Campo experimental INIFAP



Figura 2

de sanidad vegetal

Laboratorio

PROBLEMAS A RESOLVER

El cultivo de maíz es sin duda el cultivo más extendido por el país, la mancha de asfalto es la enfermedad que más ataca a este cultivo, se presenta como puntos negros en las hojas bajas y se va extendiendo hacia las demás hojas normalmente antes de que empiece la floración, después de la llegada del primer hongo aparece *Monographella maydis* que provoca el secamiento en la planta, la aparición de los puntos negros que no son más que *Phyllachora maydis*. Debe ser considerada como riesgo para el cultivo ya que la infección se disemina por hojas superiores y a otras plantas.

Debido a la poca información con la que se cuenta respecto a los mecanismos de defensa de la planta de maíz, surgió la necesidad de buscar metabolitos secundarios reportados en otras plantas y que tiene un efecto significativo en la reducción de los procesos infecciosos y que posiblemente debido a un efecto inductor la planta de maíz siga la ruta para la síntesis de fenoles.

Con la presencia de fenoles en plantas con síntomas de CMA se comprobaría que existen metabolitos que proveen a la planta de maíz un mecanismo de defensa contra patógenos que la afectan, lo que permitiría conocer más sobre la respuesta bioquímica que tiene la planta.

Cuantificando fenoles totales en 2 genotipos de maíz (híbrido y criollo) con diferentes grados de infección de *Phyllachora maydis*, se buscó encontrar una correlación entre la presencia de compuestos fenólicos y la resistencia a estos patógenos, durante la infección.

Existen reportes de presencia de fenoles en los granos de maíz que le sirven como protección a plagas cuando estos son almacenados para luego procesarlos o destinarlos al consumo, pero aun no existen reportes de cuantificación de concentraciones de fenoles en las hojas de maíz, lo que nos permitirá aumentar los conocimientos de sus procesos metabólicos.

ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances

- ❖ Se identificaron cultivos de maíz híbrido y criollo en el municipio de Ocozocoautla y se logró contactar a los dueños de dichos cultivos, lo que permitió hacer la toma de muestras.
- ❖ Se logró hacer la extracción metanólica y la cuantificación de fenoles totales.
- ❖ Los resultados obtenidos fueron los esperados.

Limitaciones

- ❖ El clima en los meses de Enero-Marzo no fue favorable para la infección por mancha de asfalto, debido a que las condiciones requeridas son de humedad y temperaturas alrededor de 17- 22 °C, esto provocó que las plantas no se enfermaran.
- ❖ La falta de equipos en el campo experimental del INIFAP provocaron que las determinaciones se realizaran en dos lugares diferentes.
- ❖ El periodo que tarda una planta en crecer y el proceso de espera para la infección provocó aplazamiento para hacer las determinaciones.

ANTECEDENTES

IMPORTANCIA DEL MAIZ EN MÉXICO

El maíz es importante, no solo por la superficie que con él se siembra, sino por lo que representa para el país, se calcula que ocho de cada diez productores agrícolas siembran esta gramínea. El grano de maíz en México constituye un producto de alta importancia en la alimentación del pueblo (COMAIZ, 2007-2015). Se tiene previsto que la superficie destinada para el cultivo de maíz en nuestro país, clasificada como marginalmente apta, será la que mayor extensión ocupe para el año 2050, pudiendo llegar a ser hasta del 43.80% del total (Monterroso et al., 2011).

El maíz es un pasto gigante domesticado de origen tropical mexicano. La planta es usada para producir granos y forraje, los cuales constituyen la base para la elaboración de un buen número de alimentos y tanto para nuestra especie como para otros animales. Actualmente el maíz es producido en la mayoría de los países del mundo; en México se producen diversas variedades, sin embargo la más importante es la del maíz blanco, México es un importante productor de este grano también es un importante consumidor aunque se cubre prácticamente la totalidad de la demanda del maíz blanco con la producción nacional, la demanda de maíz amarillo no se cubre, el promedio anual de demanda de granos amarillos es superior a 5 millones de toneladas. Este grano se produce en dos ciclos productivos: primavera-verano y otoño-invierno, bajo condiciones climáticas diversas, de humedad, temporal, riego.

Chiapas es uno de los Estados cuyo cultivo más importante es el maíz, se producen alrededor de un millón 200 mil toneladas con 841 mil toneladas por cultivo, es el Estado con mayor número de productores, 350 mil, en su mayoría, el 80% por ciento cosecha para autoconsumo (565 mil hectáreas).

A nivel nacional, Chiapas ocupa el quinto lugar en la producción de maíz, siendo su participación anual estimada en el mercado nacional del maíz en un 6%. Es un producto

con mucha importancia socioeconómica tanto por la superficie de siembra como por la cantidad de consumo *per capita*.

Clasificación del maíz

El cultivo de maíz en México se caracteriza por producir una amplia gama de variedades, por lo que es posible generar una gran cantidad de productos finales: tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructuosa, dextrosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, etc.

Tabla 1 Variedades y usos del maíz

Variedades y usos del maíz	
Nombre de la variedad	Usos
Maíz cerero o ceroso	Se utiliza en la elaboración de adhesivos y gomas.
Maíz cristalino	Como alimentos
Maíz dulce	Como alimento para enlatados
Maíz dentado	Como alimentos en la industria
Maíz palomero	Como alimentos
Maíz semidentado	Como alimento para mejoramiento genético
Maíz truncado	Para mejoramiento genético del maíz en general

Fuente: Centro de Investigación para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)

Chiapas cuenta con un conjunto de ambientes para el cultivo de maíz. En los climas cálidos (<1000m) se encuentran cuando menos nueve razas de maíz mientras que en climas semicálidos y templados (>1500 m) predominan solo dos razas. (González, *et al.*, 2005).

Genotipos de maíz

DK-357

Honduras es el país del que provienen estas semillas, son semillas de tipo híbrido, desarrolladas por Dekalb (Monsanto).

Las semillas de Maíz DK 357 presentan las siguientes características:

Tienen ciclo vegetativo que va de 125-135 días, porte de la planta intermedio, con un color y tipo de grano blanco dentado, este genotipo tiene un rendimiento estimado entre 70 - 77 ha, posee alto potencial de rendimiento, lo que implica beneficios para los productores.

Criollos

El grano es de color amarillo brillante, la mazorca tiene 20 - 25 centímetros de longitud y es gruesa. Tiene 2 a 3 mazorcas por caña, el grano es duro y pesado, la barba es blanca y sale a los 65 días. Con la formación de las razas obtenidas y con los cruzamientos interraciales se dio origen a las razas modernas, de las cuales se han obtenido los híbridos actuales de muy altos rendimientos. (Márquez, 2008).

Las semillas de maíz criollo se pueden almacenar por largos periodos, cosa que no se puede hacer con las semillas mejoradas, porque son atacadas por gorgojos muy rápido. Los maíces criollos están adaptados a nuestro ambiente y soportan sequías, suelos pobres y enemigos naturales.

MORFOLOGÍA DE LA PLANTA DE MAIZ

Reino: Vegetal

Subreino: Embriobionta

División: Angiospermae

Clase: Monocotyledoneae

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *mays*

Nombre científico: *Zea mays L.*

El maíz presenta las siguientes características botánicas. Sus raíces son fasciculadas y su misión es aportar un perfecto anclaje a la planta, algunas veces se pueden notar raíces a nivel del suelo, estas raíces son llamadas raíces secundarias, el maíz produce raíces accidentales y de refuerzo estas últimas son importantes ya que ayudan a la reducción del acame.

Su tallo es simple, en forma de caña, tiene una longitud elevada pudiendo alcanzar hasta 4 metros de altura, la diferencia de altura entre plantas se debe al genotipo, además no presenta ramificaciones. Tiene hojas alargadas y de gran tamaño, se encuentran abrazando al tallo y tienen vellosidad en el haz, la planta de maíz forma de 16 a 22 hojas, las hojas se forman en cada nodo y alternos. La espiga es de color amarilla y posee aproximadamente entre 20 a 25 millones de granos de polen, las plantas de maíz presentan inflorescencia masculina y femenina, la producción de polen sirve para fertilizar la mazorca (Maroto, 1998). En cambio la inflorescencia femenina cuando ha sido fecundada por los granos de polen se denomina mazorca.

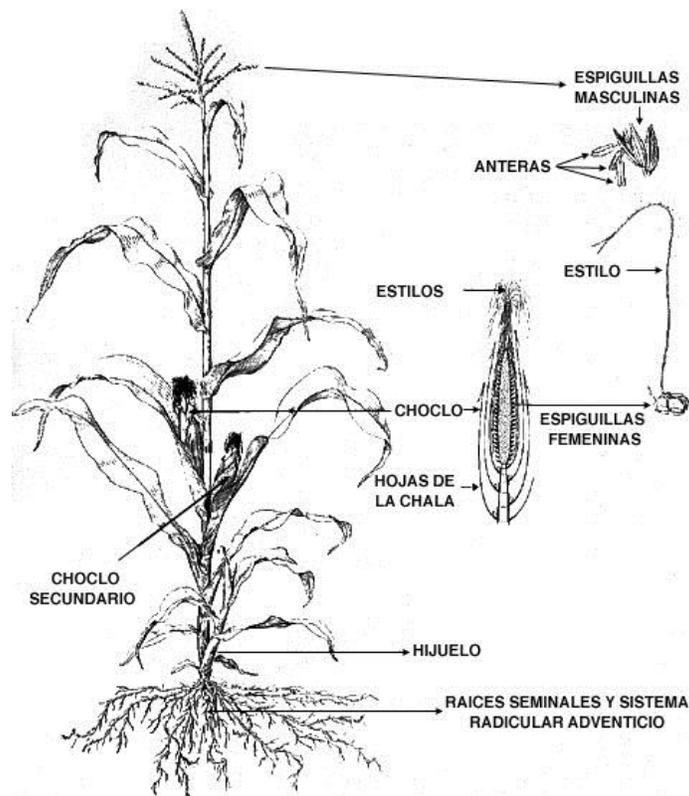


Figura 3 Planta de maíz

Características generales de la planta

El maíz requiere una temperatura de 25 a 30 °C. Para que se produzca la germinación en la semilla la temperatura debe situarse entre los 15 a 20 °C. El maíz llega a soportar temperaturas mínimas de hasta 8 °C y a partir del 30 °C pueden aparecer problemas serios debido a mala absorción de nutrientes minerales y agua. Para la fructificación se requieren temperaturas de 20 a 32 °C.

El maíz se desarrolla en suelos con pH entre 6 y 7 preferentemente. También requieren suelos profundos, ricos en materia orgánica, con buena circulación del drenaje para no producir encharques que originen asfixia radicular.

COMPLEJO MANCHA DE ASFALTO

Phyllachora maydis

La enfermedad comienza cuando *Phyllachora maydis* infecta la planta cuando esta tiene aún entre 8 y 10 hojas, la presencia de rocío por las noches o la humedad relativa >70% favorece la infección, este hongo produce lesiones oscuras pequeñas (con 0.5 a 2.0 mm de diámetro), ovaladas o redondas en las hojas, brillantes, ligeramente abultadas, debido a la morfología que presenta la colonia se le dio el nombre de mancha de asfalto a la infección por *P. maydis* la infección pasa rápidamente de las hojas bajas a las hojas superiores y a otras plantas.

Tabla 2 Taxonomía *Phyllachora maydis*

<i>Phyllachora maydis</i>	
Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Orden	<i>Phyllachorales</i>
Familia	<i>Phyllachoraceae</i>
Genero	<i>Phyllachora</i>
Especie	<i>maydis</i>

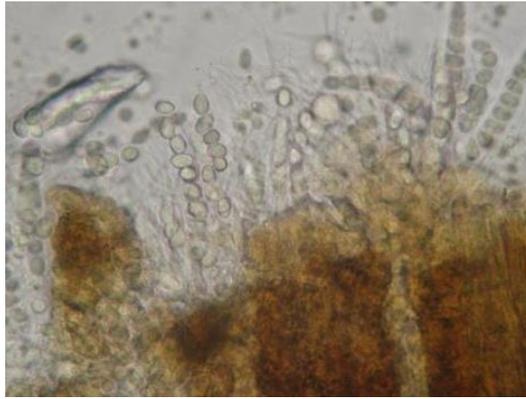


Figura 4 *Phyllachora maydis* vista al microscopio

Phyllachora maydis es un parásito obligado (Shurtleff, 1980), y *Monographella maydis* requiere la presencia del primer patógeno.

Monographella maydis

El intervalo de temperatura para la germinación óptima de *M. maydis*, es de 25-30 °C, y la germinación es más rápida en la oscuridad (Dittrich et al., 1991), corresponde a la típica del periodo de noviembre a febrero en las tierras bajas de México (Müller y Samuels, 1984). Esta aparece después de la infección por *Phyllachora maydis*.

Tabla 3 taxonomía *Monographella maydis*

<i>Monographella maydis</i>	
Reino	<i>Fungi</i>
Phyllum	<i>Ascomycota</i>
Clase	Sordariomycetes
Orden	Xylariales
Familia	-
Género	<i>Monographella</i>
Especie	<i>maydis</i>

En la figura 5 se muestra la estructura sexual de *Monographella maydis* vista al microscopio con ascosporas alargadas, ovoides, semitransparentes. En la figura 6 Se muestra *Microdochium maydis* forma asexual de *Monographella maydis*.

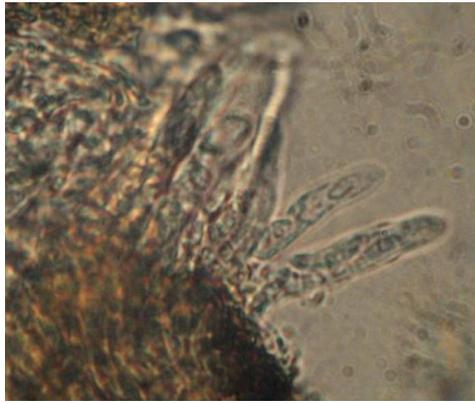


Figura 5 *Monographella maydis* vista al microscopio

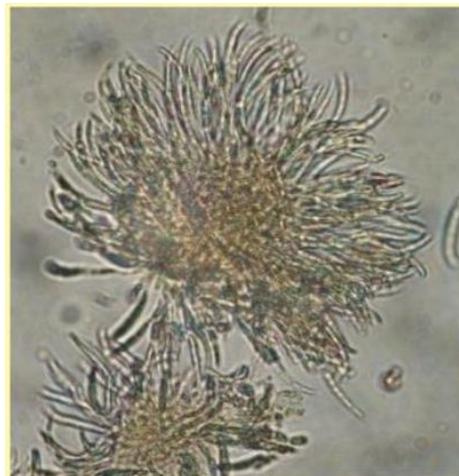


Figura 6 *Microdochium maydis* vista al microscopio

Escala del daño provocado por el CMA

El maíz es primeramente infectado por *Phyllachora maydis*, produciendo pequeñas manchas negras en forma de costras carbonosas sobresalientes, que por su aspecto se les denomina manchas de asfalto (Hock et al., 1989). Posteriormente se forma un halo necrótico alrededor de cada una de las lesiones de *P. maydis* debidas a la infección secundaria de *M. maydis*, dando origen al denominado síntoma ojo de pescado (Hock et al., 1992). De todos los organismos asociados *Monographella maydis*, el causante de la necrosis foliar, tienen el efecto más devastador; bajo condiciones favorables el follaje de la planta puede secarse completamente en menos de ocho días debido a la fusión de las lesiones de los dos organismos patogénicos y a la posible producción de una toxina.

Tabla 4 Escala de severidad para el CMA

<p>Grado 0 Hoja sana</p>	<p>Grado 1 Hoja con principio de infección por <i>Phillachora maydis</i></p>	<p>Grado 2 Hojas con más lesiones de <i>Phillachora maydis</i></p>
<p>0% severidad</p>	<p>10 % severidad</p>	<p>20% severidad</p>
		
<p>Grado 3 Grado representativo de la enfermedad por <i>Phillachora maydis</i></p>	<p>Grado 4 Aparición del segundo hongo <i>Monographella maydis</i></p>	<p>Grado 5 Secamiento de la planta</p>
<p>30% severidad</p>	<p>50% severidad</p>	<p>100% severidad</p>
		

En la tabla 4 se presenta el grado de daño provocado por el complejo de mancha de asfalto, y se muestra el porcentaje de severidad que fue evaluado junto con la concentración de fenoles en la tabla 6.

METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas que son organismos autótrofos, además de poseer metabolismo primario como todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química. Se sintetizan en pequeñas cantidades y su producción se encuentra restringida a un determinado género de plantas, familia o especie; muchos de estos compuestos intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales, además de proporcionar protección contra rayos UV.

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición, no obstante, los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura). Los terpenoides derivan del isopentenil difosfato (IPP) y se conocen unos 25.000. Los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno y derivan principalmente de aminoácidos, de ellos se conocen unos 12.000. Mientras que los aproximadamente 8.000 fenilpropanoides provienen de las llamadas vías biosintéticas del shikimato o del malato/acetato.

Las plantas también utilizan los metabolitos secundarios como agentes de señalización durante la interacción con patógenos. Tras la infección con un patógeno, algunas especies vegetales, tales como el tabaco, trigo, pepino y arroz, desarrollan una resistencia hacia otros patógenos. A esta resistencia se la ha denominado resistencia sistémica adquirida (SAR del inglés systemic acquired resistance), y puede ser transmitida desde una parte a otra de la misma planta. Uno de los compuestos implicados en la transmisión de la señal es el ácido salicílico, un metabolito formado a partir del ácido cinámico. El ácido salicílico puede metilarse siendo así volátil, por lo que

incluso permite activar la respuesta sistémica adquirida en las plantas vecinas (Bourgaud, 2001).

Además de su importancia para la defensa de la planta frente a microorganismos, los metabolitos secundarios también permiten atraer a microorganismos simbiotes.

Fenoles

Los compuestos fenólicos o polifenólicos se caracterizan por poseer un anillo aromático teniendo uno o más sustituyentes hidroxilo.

El aumento en el contenido de fenoles inhibe el crecimiento y regeneración de plantas, además, estos actúan como antioxidantes y como sustancias estructurales en los tejidos suberosos, protegiendo del secamiento y ataque de patógenos. Como mecanismo de defensa las plantas poseen un sin número de sustancias tóxicas para los organismos patógenos, existen una gran variedad de alcaloides, fenoles simples o polifenoles (taninos) y terpenos en general (fitoalexinas). Muchos de los fenoles son almacenados en el interior de la vacuola celular.

Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales:

- **Como captores de radicales libres:** los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en los que están implicados los radicales libres.
- **Como quelantes de metales:** esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático de esta manera los
- *o*-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton (García, 2005).

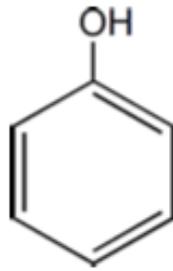


Figura 7 Estructura química del fenol

Los compuestos fenólicos de las plantas también dan aroma, sabor y color a muchas bebidas tanto alcohólicas como no. Por ejemplo, el ácido clorogénico, protector frente agresiones de la superficie de algunos vegetales, constituye aproximadamente el 4% del peso seco del grano de café. Las hojas del té verde y negro contienen otros fenoles tales como catequinas y otros taninos que imparten el sabor característico a sus infusiones. La mayoría de las bebidas que se consumen hoy día serían básicamente agua si no fuera porque llevan en su composición compuestos fenólicos como la vainillina, ácido ferúlico, taninos, etc. Una tarea importante para las industrias alimenticias y de fragancias es la de identificar las mezclas de compuestos fenólicos que proporcionen sabores agradables, desde el sirope de arce hasta el whisky.

Propiedad antioxidante y antirradical de los compuestos fenólicos

Se consideran radicales libres aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Son muy reactivos y con una enorme capacidad para combinarse con diversas moléculas que integran la estructura celular, como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de ellos (González et al., 2000).

Las especies oxigénicas reactivas (ROS) son radicales libres, átomos de O₂ con siete electrones y que contienen un electrón desapareado que les provoca alta reactividad. Los ROS producen diversas acciones sobre las células, el radical libre puede tomar un electrón de la membrana celular provocando así otro radical libre, lo que da lugar a una reacción en cadena, además puede producir pérdida de fluidez y lisis celular, en las proteínas provoca inactivación o desnaturalización, en los ácidos nucleicos modifica las bases produciendo mutagenesis y carcinogénesis.

Muchos compuestos químicos tienen la capacidad de inhibir a los radicales libres en el organismo o impedir su formación y se les conoce como compuestos antioxidantes, que por definición son sustancias que estando presentes a baja concentración con respecto a una molécula oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de este sustrato (García et al., 2001).

Los antioxidantes reaccionan con los radicales libres para formar compuestos estables no reactivos, proceso conocido como “atrapamiento (captura) de radicales libres”. Existen abundantes fuentes de antioxidantes en diversos tipos de plantas, vegetales, frutas, hojas, cereales, En la mayoría de ellos los compuestos que le imparten la propiedad antioxidante son los fenoles, en diversas formas, fenoles simples, flavonoides y/o taninos (Pérez, 2003).

Ruta del ácido shikímico

Se derivan compuestos fenólicos a través de la ruta fenilpropanoide, sintetizados a partir de fenilalanina y tirosina, estos a su vez son provenientes de la ruta del ácido shikímico.

La vía de shikimato vincula el metabolismo de hidratos de carbono a la biosíntesis de compuestos aromáticos. En una secuencia de siete pasos metabólicos, fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato se convierten a corismato, el precursor de los aminoácidos aromáticos y muchos metabolitos secundarios aromáticos. Todos los compuestos intermedios de la vía también pueden ser considerados compuestos de punto de ramificación que pueden servir como sustratos para otras vías metabólicas. La vía de shikimato se encuentra sólo en microorganismos y plantas, nunca en animales (Herrmann et al., 1999)

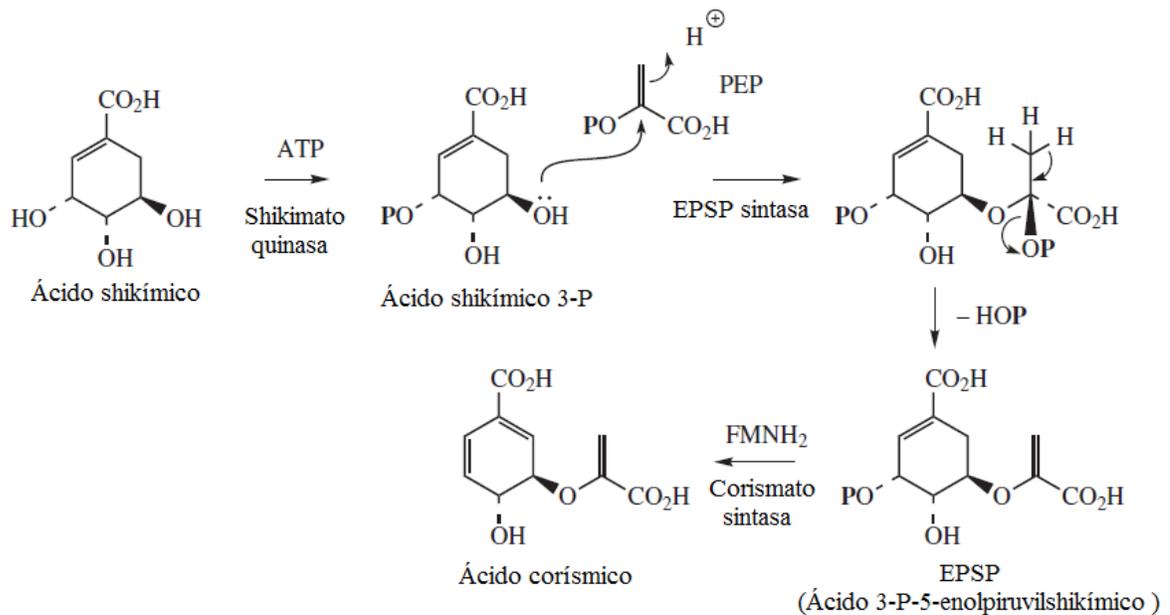


Figura 8 Ruta del ácido Shikímico

Fenoles en otras especies vegetales

La infección de un patógeno induce el aumento de compuestos fenólicos en la planta (Hachiro, 1994). La base fisiológica y bioquímica de la resistencia de plantas al ataque de patógenos, hongos y bacterias; se encuentra relacionado con la biosíntesis de metabolitos secundarios (García, 2003).

Muchos cambios bioquímicos ocurren en la planta después de la infección, estos cambios se han relacionado con la capacidad de producir mecanismos de defensa.

Las plantas además hacen uso de antibióticos, ya sean del grupo de los compuestos fenólicos, de los alcaloides o de los terpenoides. A diferencia de los sintéticos, los antibióticos naturales no tienen un modo de acción especie-específico, por lo que por ejemplo, atacan las membranas celulares de los patógenos y para que sean efectivos, se requieren a altas concentraciones en la zona a defender. Ejemplos de antibióticos naturales son, dentro del grupo de los compuestos fenólicos, algunos isoflavonoides de leguminosas; de los terpenos están los sesquiterpenos tales como el capsidiol, sintetizado por la planta de tabaco. Mientras que son pocos los alcaloides que puedan

actuar como antibióticos, como ejemplo está el de la benzofenantridina. Las concentraciones de fenoles aumentan cuando hay un ataque de algún patógeno como mecanismo de protección al tejido dañado. El incremento de fenoles y acumulación de fitoalexinas estimulan la resistencia en plantas de café (Guedes et al. 1994). En duraznos californianos se encontró producción de los ácidos clorogénico y cafeico que pertenecen al grupo de compuestos fenólicos (Gradziel et al.1998). Algunas enzimas se relacionan con el grado de susceptibilidad de las plantas a enfermedades; tal es el caso de la fenilalanina amonio-liasa (FAL) que participa en la formación de fitoalexinas y fenilpropanoides (Mansfield, 1983) involucrados en la producción de flavonoides, cumarinas, ligninas, y otros compuestos asociados a la resistencia de enfermedades. Por ellos la presencia y la actividad de esta enzima (FAL) es un indicativo de que existen mecanismos de defensa en las plantas y que se activaran cuando exista presencia de un patógeno.

Las furanocumarinas forman parte de un tipo de la cumarina con fitotoxicidad, estos compuestos normalmente no son tóxicos, hasta que son activados por la luz (UV-A), la energía de este tipo de luz provoca que estos compuestos sean activados a un estado electrónico de alta energía, que puede insertarse en la doble hélice del ADN y se unen a la base pirimidina bloqueando la transcripción y la reparación lo que provoca la muerte celular. (Couder, 2012)

Fenoles en maíz

Hay reportes de fenoles en los granos de maíz, se ha reconocido su efecto protector contra diversas plagas en campo y en almacén (Ventura, 2004), debido probablemente al efecto antagónico que ejercen sobre hormonas y enzimas en los insectos, por lo que pueden actuar como bioinsecticidas.

Participan también en el desarrollo del color grisáceo en masa y tortilla (Salinas et al., 2007).

MÉTODO FOLIN-CIICALTEAU

La técnica de cuantificación de fenoles libres y totales por el método de Folin-Ciocalteu ha llegado a ser uno de los más utilizados; esta técnica se basa en la propiedad de los fenoles de reaccionar frente a agentes oxidantes, este reactivo contiene molibdato y

tungstato sódico que al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes, forman complejos fosfomolibdico fosfotúngstico. En medio básico la transferencia de electrones reduce estos complejos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), cromógenos de color azul intenso que son proporcionales a la cantidad de grupos fenólicos presentes en la molécula de interés (Peterson, 1979) . Esta coloración se cuantifica por espectrofotometría a 760nm con base a una curva patrón de ácido gálico.

Este método se encuentra registrado en diferentes trabajos, con respecto a la cuantificación de fenoles en plantas o en productos alimenticios (vinos, tés, jugos), debido a que es un método simple y muy preciso.

METODOLOGÍA

Inoculación en campo

Se sembraron semillas de maíz en vasos de unicel de un litro con peat moss en el invernadero, una semilla por cada vaso, se sembraron tres genotipos diferentes con cuatro repeticiones cada genotipo, a los quince días después de la germinación se trasladaron a Guadalupe Victoria municipio de Ocozocoautla, se dejaron debajo de plantas de maíz que se encontraban infectadas por *Phyllachora maydis*, por un periodo de 7 días para asegurar su infección, a los 7 días se trasladaron al invernadero del Inifap y se trasplantaron. Se mantuvo la humedad en la tierra regando cada dos horas o cada que la tierra se encontraba seca.

Inoculación en cámara húmeda

Se sembraron en vasos de unicel con peat moss semillas de maíz, una semilla por cada vaso, se sembraron tres genotipos con cuatro repeticiones cada uno, a los quince días después de la germinación de la semilla se colocaron las plantas en una cámara con humedad controlada, dicha cámara se selló de manera que la humedad se conservara y se le añadió un humidificador que mantenía la humedad a 90%.

Para la inoculación se cortaron lesiones de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y se maceraron, los fragmentos se resuspendieron en 1 mL de agua estéril y se contaron las esporas en la cámara de Neubauer.

La concentración de esporas requerida para la inoculación fue de 1×10^3 cuando se obtuvo esta concentración se agregó 0.1 gr de agar a la solución y se asperjó con un atomizador a las plantas. Las plantas se colocaron en la cámara y se mantuvieron ahí durante dos días.

Material vegetal

Para la extracción de fenoles se tomaron hojas de las plantas iniciando con plantas sanas y con infección por *Phyllachora maydis* (grado 3), se cortaron lesiones de *Phyllachora maydis* cuidando de no cortar demasiado tejido vegetal.

Para las pruebas el material vegetal se pulverizará con nitrógeno líquido y se pesará la cantidad necesaria para cada determinación.

Selección y recolección de muestras.

La parcela con genotipos de maíz híbridos que fue seleccionada para la cuantificación de fenoles se encontraban en colonia Guadalupe Victoria municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas. Dichas parcela tenía sembradas plantas de maíz adultas e infectadas por el complejo mancha de asfalto, pero únicamente se recolectaron muestras de *Phyllachora maydis* debido a la escasa cantidad de *Monographella maydis*.



Figura 9 Parcela con genotipos híbridos

La parcela con plantas de maíz criollo se encontraba localizada en la colonia Ignacio Zaragoza municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas. Se recolectaron muestras de plantas sanas y de plantas enfermas con *Phyllachora maydis*.



Figura 10 parcela con genotipos criollos

Obtención de extractos metanólicos

Se pesaron 2g del material vegetal pulverizado y se colocaron en un matraz Erlenmeyer junto con 25 mL de metanol, esta mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas, al término de las 2 h la mezcla fue colocada en tubos Falcon de 50 mL y centrifugada a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se evaporó al vacío a una temperatura de 45° C y el residuo que se obtuvo se resuspendió en 1 mL de metanol para su almacenamiento a 20 °C hasta su uso.

Extracción de fenoles totales

A 0.1 mL de la muestra almacenada se le colocó 4.2 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Se agitó en vortex durante un minuto, se añadió 1mL de solución de carbonato de sodio al 2% y 4.2 mL de agua destilada.

La mezcla se dejó en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, después de transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 760 nm. Los resultados fueron expresados en términos de equivalentes de ácido gálico (mg g^{-1})

Realización de la curva patrón

Se utilizó el método Folin-Ciocalteu empleando ácido gálico como estándar. Siendo la metodología empleada reportada por Singleton et al. (1999). Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/g de muestra.

RESULTADOS

La inoculación en campo y en cámara no fue la esperada debido a que las condiciones requeridas para la propagación de la enfermedad no eran las adecuadas, la infección por *Phyllachora maydis* solo se presentó en las hojas bajas de las plantas pero no se propagó a las hojas superiores.

El secamiento de las hojas bajas y la poca humedad en el invernadero provocaron que la infección no se propagara a las hojas superiores.

Curva patrón

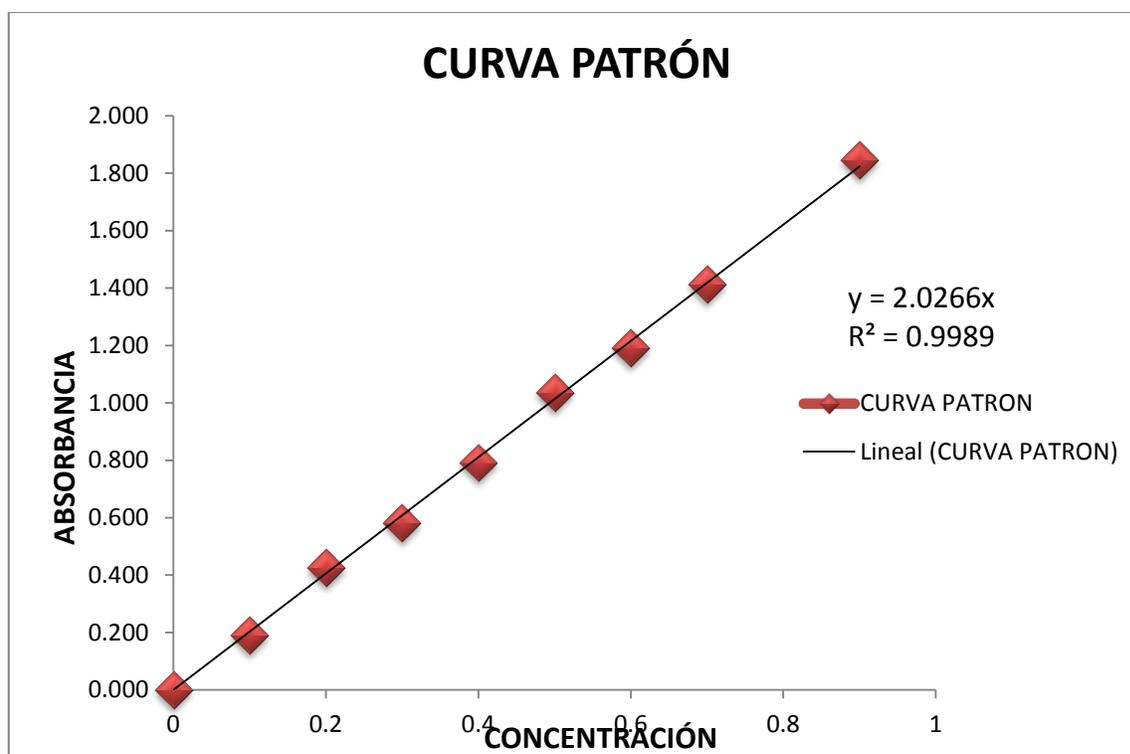


Figura 11 curva patrón de ácido gálico (mg de ác. Gálico/g)

El valor de la $R^2=0.9989$ nos da la certeza de que los resultados son confiables

Finalmente se cuantificó la cantidad de fenoles totales presentes en una muestra de extracto de cada planta y con las condiciones de enfermedad. En la tabla 5. Se expresan los valores en mg de ácido gálico/g. Todas las muestras de maíz evaluadas resultaron positivas a polifenoles de acuerdo con la técnica cualitativa.

Tabla 5 comparación de concentraciones

Muestra	Conc. Mg/g	Muestra	Conc. Mg/g
Ms1	0.0828	Ms2	0.2639
Me3	0.4418	Me4	0.2349

Ms1 y Ms2 corresponden a los genotipos de las plantas sanas, Me3 y Me4 corresponden a los genotipos de las plantas enfermas. Ms1 y Me3 son genotipos criollos o nativos provenientes de la comunidad de Guadalupe Victoria, Ms2 y Me4 son genotipos híbridos recolectados en la comunidad de Ignacio Zaragoza.

Tabla 6 Análisis estadístico

Tratamiento	Conc.mg de Gálico/ g	de á. Severidad
Maíz criollo sano	0.0828 c	0.0 c
Maíz híbrido sano	0.2639 b	0.0 c
Maíz criollo enfermo	0.4418 a	30.0 a
Maíz híbrido enfermo	0.2350 b	10.0 b
Promedio	0.2554	10
CV (%)	7.05	1.11

Valores con letras diferentes tienen diferencias significativas ($p > 0.05$)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la inoculación no fueron los esperados debido a que las condiciones requeridas por estos hongos no eran las adecuadas, aun cuando se tuvo más humedad de la requerida por el hongo no se propagó la enfermedad, no existen reportes de inoculación de *Phyllachora maydis* y *Monograpella maydis* en invernadero debido a que son hongos que no pueden cultivar.

Los datos obtenidos de la curva patrón del ácido gálico se muestran en la tabla 4. Y a manera de gráfico en la figura 12. Los datos obtenidos muestran una buena linealidad

(0.9989) lo cual nos permite hacer una buena cuantificación de fenoles totales en cada muestra de planta de maíz, usando como referencia la antes mencionada curva de calibración.

El método de Folin se usa ampliamente para medir Fenoles en tejidos de plantas, sin embargo, puede haber reacciones con sustancias reductoras diferentes a los compuestos fenólicos, como azúcares o ácido ascórbico (Robbins, 2003; Ainsworth y Gillespie, 2007).

Los resultados obtenidos indicaron que todas las muestras analizadas contienen compuestos fenólicos totales. De acuerdo con Oziyigit (2008), los compuestos fenólicos son sintetizados en las hojas y luego son transportados a otros tejidos y órganos. Por lo tanto, la cantidad total de estos compuestos en las hojas son mayores que en otros órganos y tejidos de las plantas. Durante el período previo a la maduración foliar, las hojas muestran una mayor vulnerabilidad a factores bióticos y abióticos por lo tanto la infección por el complejo mancha de asfalto afecta la planta.

Se encontró que la cantidad de fenoles en las plantas sanas de genotipos criollos es menor a la concentración de fenoles totales en plantas enfermas por *Phyllachora maydis*, esto nos da una idea de cómo responden al ataque de un patógeno, los resultados presentados para los genotipos híbridos son un caso contrario al de los criollos ya que la mayor concentración de fenoles se obtuvo en plantas sanas; esto pudo haber estado influenciado por diversos factores, uno de ellos es que las plantas híbridas son más susceptibles a cambios climáticos, cambios en la composición del suelo, etc. Otro de los factores que pudo desencadenar la síntesis de compuestos fenólicos es la presencia de algún otro patógeno o plaga que no fue identificado al momento del muestreo, pero que ya había desencadenado la producción de metabolitos secundarios.

El análisis estadístico nos muestra que existe diferencia entre tratamientos y se indican con letras, para el caso de los genotipos híbridos no existe diferencia estadística significativa cuando la planta está sana y cuando está enferma.

Se hicieron arreglos en la variable de severidad (severidad transformada) para poder obtener mayor confiabilidad en los resultados, y el promedio se obtuvo de esta variable se obtuvo sin la transformación de los datos.

CONCLUSIONES

Se logró hacer la cuantificación del contenido de fenoles totales conocidos por su actividad antioxidante en plantas de maíz

En general una planta con mayor contenido de compuestos fenólicos totales presenta una mayor actividad antioxidante. De los resultados obtenidos se observa una clara relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos, como se esperaba. Sin embargo, se recomienda realizar estudios que permitan determinar qué compuestos específicos (sean primarios o secundarios), son los responsables de la actividad antioxidante y que otros compuestos podrían estar interviniendo en el mecanismo de defensa de la planta.

Es recomendable hacer un análisis de las concentraciones de fenoles cuando la planta de maíz se encuentra invadida por los hongos que comprenden el complejo de mancha de asfalto ya que pueden existir variaciones en las concentraciones de fenoles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

Ainsworth, A. E., and K. M. Gillespie. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2(4):875-877.

Alcantar- Aguirre F. 2005. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Cinvestav-irapuato.

Bourgau F, Gravot A, Milesi S and Gontier E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci, 161, 839-851.

COMAIZ (2007:15). COMAIZ. Importancia del Maíz:

<http://www.comaiz.mx/importancia-maiz/>

Couder B. (2014). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIRRADICAL Y ANTIVIRAL DE POLIFENOLES PURIFICADOS DE *Ardisia escallonioides* E *Hypericum silenoides*.

Dittrich U, Hock J, Kranz J, Renfro BL, 1991. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. Cryptogamic Botany, 2:214- 218.

García A. (2005). Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Facultad de veterinaria y Ciencia y Tecnología de los alimentos, Universidad de Murcia, España.

García, L., L. García, D. Rojo y E. Sánchez. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. Revista Cubana Investigaciones Biomédicas 20(3):231-235.

García Mateos R., y Pérez Leal R. 2003. fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. Rev. Chapingo. Series forestales y del ambiente. 9(1):5-10

G.L. Peterson, Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, Analytical biochemistry, Vol.100 No.2, 1979, 201-220.

González, C., M. Betancourt y R. Ortiz. 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica* 25(1):3-10.

González-Espinoza M., Ramírez-Marcial N. y Cruz-Montoya L. 1era Edición. Editorial plaza y Valdés, S.A. de C.V. 430-435 pp.

Gradziel T M, M A Thorpe, R M Bostock, S Wilcox (1998) Breeding for brow rot (*Monilinia fructicola*) resistance in clingston peach with emphasis on the role of fruit phenolics. *Acta Hort.* 465:161169.

Guedes M.E, Guerra-Guimaraes L.E, Silva A.M.S, Cavaleiro J.A.S (1994) Total phenols and phytoalexins accumulation in coffee leaves infected with *Hemileia vastatrix* Berk et Br. and *Pseudomonas syringae*. *Acta Hort.* 381:561564.

Hachiro O (1994) *Plant Pathogenesis and Disease Control*. Ed. CRC Press. USA. 193 p.

Herrmann KM1, Weaver LM. 1999. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999 Jun;50:473-503.

Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1989. El “complejo mancha de asfalto” del maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7(2):129-135.

Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1992. Tests of standard diagrams for field use in assessing the tarspot disease complex of maize (*Zea mays*). *Tropical Pest Management* 38:314-318.

<http://www.observatoriodesicta.info/es/inventariotec/semilla/dk-357>

López C., Salazar O., Dax R., Osorio M., Calderón C., Cabrera H., Ferrufino A., Viana A., y Saavedra D. 2011. Reconocimiento en campo de la mancha de asfalto en el cultivo de maíz.

Mansfield J W, (1983) Antimicrobial compounds. In: J. A. Callow (ed.). Biochemical Plant Pathology. Ed. John Wiley & Sons. Hampshire, U.K. pp: 237-265.

Maroto, J. 1998. "Horticultura herbácea especial". 4ta Edición. Ediciones Mundi Prensa. Madrid-España. 589-593 pp.

Márquez-Sánchez F. 2008. De las variedades criollas de maíz (*Zea Mays*) a los híbridos transgénicos. Recolección de germoplasma y variedades mejoradas. Rev. Agricultura, sociedad y desarrollo. Volumen 5, numero 2.

Mauricio, S. R.; Figueroa, J. D. y Taba, S. 2004. Caracterización de accesiones de maíz por calidad de grano y tortilla. Rev. Fitotec. Mex. 27:213-222.

Monterroso, A. I.; Conde, A. C.; Rosales D. G.; Gómez, J. D. y Gay, G. C. (2011). Assessing current and potential rainfed maize suitability under climate change scenarios in México. *Atmósfera* 24(1):53-67.

Muller E, Samuels GJ, 1984. *Monographella maydis* sp. nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia* 40:113-121.

Pérez T, G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 22(1):48-57.

Robbins, J. R. 2003. Phenolic acids in food: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2866-2887.

Salinas, M. Y.; Saavedra, A. S.; Soria, R. J. y Espinosa, T. E. 2008. Características fisicoquímicas y contenido de carotenoides en maíces (*Zea mays* L.) amarillos cultivados en el Estado de México. *Agric. Téc. Méx.* 34(3):357-364.

Shurtleff, M.C., ed. 1980. *Compendium of corn diseases*. 2da ed. American phytopathological society, St. Paul, MN.

SIAP, 2012. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx.

Ozyigit, I.I. 2008. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. *Afr. J. Biotechnol.* 7:1145-1150.

Ventura, P. R. I. 2004. Evaluación nutrimental y nutracéutica de la hoja de chaya. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, México. 106.

ANEXOS

Tabla 7 valores para la curva patron

concentracion (mg/mL)	rep 1	rep 2	rep 3	promedio
0.9	1.853	1.871	1.812	1.847
	1.853	1.878	1.812	
0.7	1.435	1.423	1.389	1.413
	1.419	1.427	1.385	
0.6	1.126	1.192	1.284	1.192
	1.123	1.206	1.218	
0.5	1.047	1.062	1.002	1.037
	1.047	1.06	1.002	
0.4	0.787	0.816	0.781	0.791
	0.782	0.805	0.773	
0.3	0.606	0.586	0.55	0.582
	0.612	0.586	0.549	
0.2	0.452	0.412	0.41	0.424
	0.453	0.408	0.408	
0.1	0.186	0.191	0.192	0.191
	0.187	0.192	0.195	
0	0	0	0	0.000
	0	0	0	

Tabla 8 concentración en mg de ác. Gálico /g de las muestras

	Muestras	mg de ac. gálico/g	promedio mg/g
sanas Criollo	Ms1	0.0855	0.0828
	Ms1	0.0757	
	Ms1	0.0796	
	Ms1	0.0904	
sanas hibrido	ms2	0.255	0.263975
	Ms2	0.2609	
	Ms2	0.2678	
	Ms2	0.2722	
enfermas criollo	Me3	0.4035	0.44185
	Me3	0.4422	
	Me3	0.4393	
	Me3	0.4824	
enfermas hibrido	Me3	0.2271	0.23495
	Me4	0.2237	
	Me4	0.2521	
	Me4	0.2369	