



# Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación

## Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Horticultura		
Tema estratégico (ANA/PEP):	INSUMOS DE NUTRICIÓN VEGETAL Generar estudios sobre nuevas formulaciones de fertilizantes órgano-minerales						
Línea de investigación:	Ecofisiología y Nutrición Vegetal						
Título del proyecto:	Biofortificación con yodo en tomate y lechuga utilizando complejos de yodo-quitosán						
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$72,000	El proyecto es:	Nuevo	<input checked="" type="checkbox"/>	Continuación		
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	<input checked="" type="checkbox"/>	Tecnológica	e-mail del responsable abenmen@gmail.com		
Vinculación:	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	Fondos concurrentes:	Uso de equipo y laboratorios y apoyo de personal técnico		
Cooperante(s):	CIQA y COLPOS						
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo				
Localidades:	Saltillo						
A realizar durante el(los) año(s):	2018, 2019 y 2020.						
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma			
Responsable	Dr. Adalberto Benavides Mendoza	3612	3303				
Colaborador:	Dr. Antonio Juárez Maldonado	3614	4103				
Colaborador:	Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente	3612	3864				
Colaborador:	Dra. Susana González Morales	Cátedras CONACYT	100062				
Colaborador:	Dra. Hortensia Ortega Ortiz	CIQA	Externo				
Colaborador:	Dra. Libia Trejo Téllez	COLPOS	Externo				
		Grado por obtener	Matrícula	Firma			
Tesista:	Irma Esther Dávila Rangel	Doctorado	61151353				
Programa Docente:	Doctorado en Agricultura Protegida.						
Tesista:							
Programa Docente:							
Tesista:							
Programa Docente:							
	Vo. Bo.			Autoriza			
Firma y sello							
Nombre							Dr. Víctor Manuel Reyes Salas Jefe de Departamento

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

## Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Biofortificación con yodo en tomate y lechuga utilizando complejos de yodo-quitosán.

\$72,000

### 2.- Introducción

El Yodo es un elemento perteneciente al grupo VII A de la tabla periódica, es un halógeno, no metálico, con masa atómica de 126.904 y número atómico de 53. Se encuentra en mayor proporción en los océanos, principalmente en el agua y en organismos como las algas cafés del genero *Laminaria*, las cuales liberan a la atmosfera compuestos inorgánicos y órgano-yodados como: yodo molecular ( $I_2$ ),  $CH_2I_2$ ,  $CHI_3$  (Moore y Groszko, 1999; Jones et al., 2010). El yodo también se puede encontrar en: suelos, rocas y agua. El ciclo geoquímico del yodo le confiere propiedades únicas, debido a su volatilidad y movilidad entre los ecosistemas (Fuge y Johnson, 2015).

El Yodo es un elemento esencial para el ser humano, debido a que forma parte de la glándula tiroides específicamente de las hormonas triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (también conocida como: (3,5,3',5'-tetrayodotironina, T4 o tiroxina). Es un elemento que interviene en el crecimiento y el buen desarrollo del cerebro durante la etapa fetal, la ausencia o déficit de yodo durante esta etapa puede tener consecuencias irreversibles (Zimmermann, 2008). Una dieta baja en yodo puede ocasionar: déficit mental, bajo coeficiente intelectual, bocio, hipertiroidismo, cretinismo y muerte al nacer, a estos padecimientos, se les conoce comúnmente como desordenes por deficiencias de yodo (IDD). Por otra parte, se ha demostrado que el yodo es capaz de actuar como antioxidante y antiproliferativo de células malignas (Anguiano y Aceves, 2011; Aranda et al., 2013). La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2007) estimó que alrededor de  $2 \times 10^9$  individuos tienen una nutrición inadecuada de yodo, de los cuales  $266 \times 10^6$  son niños en edad escolar (de Benoist et al., 2008). La principal fuente de consumo de yodo es por medio de los alimentos, aunque en algunas regiones se obtiene por medio del agua (Fuge y Johnson, 2015). El yodo en los alimentos es fácilmente asimilado y rápidamente disponible (Weng et al., 2014). Las plantas pueden asimilar el yodo a través de las raíces o directamente por los estomas en las hojas a partir del yodo gaseoso presente en la atmosfera. Desde el año de 1920 se ha aplicado la yodación universal de la sal de mesa que ha disminuido la deficiencia de yodo en la población humana; sin embargo, en promedio un 40% del yodo en la sal de mesa se volatiliza durante el almacenaje y otro porcentaje variable se pierde durante la cocción de los alimentos. Además, en muchos países se ha promovido un menor consumo de sal. Como medida alternativa para aumentar la ingesta de yodo se ha propuesto la biofortificación de cultivos, ya que en los complejos orgánicos de yodo ocurre menor volatilización (Medrano et al., 2016).

En cuanto a la forma química de yodo la mayor parte de los estudios reportan el uso de yoduro de potasio y yodato de potasio, siendo esta última la más común (Medrano et al., 2016). Algunos autores reportan efectos positivos al aplicar sales de yodo en diversos cultivos, tales como: aumento en el crecimiento, aumento en capacidad antioxidante, presencia de yodo en partes comestibles tanto de frutos y hojas (Weng et al., 2003; Leyva et al., 2011; Smolen et al., 2015), sin embargo, otros autores reportan efectos negativos como: necrosis, clorosis, disminución en crecimiento (Hong et al., 2008; Lawson et al., 2015). Algunos otros autores, han reportado resultados intermedios (Blasco et al., 2008; García-Osuna et al., 2014). Sin embargo, al aplicar yodo al suelo en forma de sales, este puede volatilizarse. El

yodo aplicado en suelo se encuentra disponible solo por un corto de periodo de tiempo (Lawson et al., 2015), esto se debe en parte a su alta tasa de volatilización. Un estudio realizado por Whitehead en 1981, reportó que en 11 de 25 tipos de suelo había pérdida de yodo por volatilización al añadir KI, sobre todo en aquellos suelos carentes de materia orgánica.

La alternativa que sugerimos ante esta situación es acomplejar el yodo con un biopolímero de quitosán. El quitosán es un biopolímero natural, biodegradable el cual se obtiene en forma de quitina de los crustáceos y en menor proporción de insectos y hongos. La quitina debe sufrir una reacción alcalina o acida para poder des-acetilar el polímero, una vez que ocurre esto, los grupos amino de la quitina quedan disponibles y esta molécula es conocida como quitosán la cual sirve para acomplejar metales y no metales. Por lo cual, con este biopolímero pretendemos captar el yodo y dejarlo disponible por más tiempo en sustrato, evitando así su fácil volatilización.

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de los complejos de yodo-quitosán en forma líquida y sólida (hidrogel) en plantas y plántulas de lechuga y tomate.

### Objetivos específicos

1.1 Evaluar en plántulas y plantas de tomate y lechuga el contenido de yodo y otros nutrientes minerales al aplicar el complejo de yodo-quitosán en comparación con el uso de sales de yodo.

1.2. En caso de toxicidad determinar la incidencia y severidad de todos los tratamientos en plántulas y plantas de tomate y lechuga.

1.3. Determinar el impacto de los tratamientos aplicados sobre las variables agronómicas, morfológicas y bioquímicas en plántulas y plantas de tomate y lechuga.

## Hipótesis

El complejo de yodo-quitosán permite una liberación prolongada del yodo, evitando así su fácil volatilización y aumentando su disponibilidad en cultivos de lechuga y tomate.

## 3.-Revisión de Literatura

### 3.1. *El Yodo en el medio ambiente.*

La principal característica que diferencia al ciclo del yodo de otros elementos, es que es volátil. El principal reservorio del yodo es el océano. El proceso más importante del ciclo geoquímico del yodo es la transferencia del yodo de los océanos a la atmosfera. El yodo es liberado de la superficie del océano por fotooxidación química, es decir cuando los iones yoduro son expuestos a la radiación solar (Miyake y Tsunogai, 1963). En agua de mar el yodo se encuentra en forma de aniones como yoduro ( $I^-$ ) y yodato ( $IO_3^-$ ) con cantidades variables de formas orgánicas unidas (Wong, 1991). El estado termodinámicamente más estable del yodo inorgánico y el más abundantes en agua de mar es  $IO_3^-$  (Sillen, 1961).

A partir de algas y microalgas se liberan a la atmosfera diversas formas de yodo tales como: Metil yoduro ( $CH_3I$ ), di yodo metano ( $CH_2I_2$ ), cloro yodo metano ( $CH_2ICl$ ) yodo bromo metano ( $CH_2IBr$ ), pero la mayor fuente de yodo

atmosférico marino es el I<sub>2</sub> (Jones et al., 2010; Saiz-López et al., 2012). El género *Laminaria* produce grandes cantidades de yodo, sin embargo, otros autores han reportado que especies como diatomeas son las mayores fuentes de yodo (Moore et al., 1996; Manley y de la Cuesta, 1997). Algunos autores han reportado que tanto los géneros de *Laminaria*, algas rojas y algas cafés liberan yodo bajo condiciones de estrés y estrés oxidativo (Küpper et al., 2008; Dixneuf et al., 2009; Chance et al., 2009). Los compuestos órgano-yodados una vez liberados en la atmosfera son foto disociados produciendo compuestos como HI, INO<sub>2</sub>, IONO<sub>2</sub> IO, OIO (Kaltsoyannis y Plane, 2008). La presencia de óxido de yodo en la atmosfera ha sido ligada a la formación de partículas ultra finas, importantes en la condensación de nubes (O'Dowd et al., 2002). El yodo se encuentra en menor proporción en ríos, lagos, suelo. En la corteza terrestre hay alrededor de 0.5 mg kg<sup>-1</sup>, en el océano hay entre 45 y 60 µl L<sup>-1</sup> y en la atmosfera la concentración tiene un rango de 10 a 20 ng m<sup>-3</sup> dependiendo del mar y del tipo de suelo (Moreda et al., 2011). Otra fuente de yodo que se encuentra en la atmosfera proviene de combustible fósiles, lo cual representa un promedio de 4 mg kg<sup>-1</sup> y 1mg kg<sup>-1</sup> en petróleo. El deposito en suelos es debido al desgaste de rocas, actividad volcánica, descomposición de la vegetación, lluvia y actividades humana. Los niveles en suelo representan un rango amplio que va desde <0.1 a 150 mg kg<sup>-1</sup> dependiendo del tipo de suelo y de la cercanía con el océano.

### 3.2. Yodo en la salud.

El yodo es un elemento traza esencial para el ser humano, forma parte de la glándula tiroides específicamente se encuentra en las hormonas T3 y T4. Estas hormonas son esenciales para el metabolismo celular, crecimiento, desarrollo de estructuras del cuerpo, función y desarrollo neuronal (Underwood, 1977; Zimmermann et al., 2008). Las hormonas T3 y T4 son lipofilicas y esta característica les permite atravesar la barrera de la placenta, por lo tanto, el feto está expuesto a estas hormonas (ICRP, 2001)

El consumo de yodo recomendado por la WHO es de 150 µg día<sup>-1</sup> para adulto y adolescentes arriba de 13 años, 200 µg día<sup>-1</sup>, para mujeres embarazadas y en lactancia, 120 µg día<sup>-1</sup>, para niños entre 6-12 años y de 90 µg día<sup>-1</sup> para niños de 0-50 meses de edad (FAO, 2005; WHO, 2001). Del 79% al 90% del yodo presente en el cuerpo se encuentra en la glándula tiroides (Hays, 2001). El 95% del yodo se encuentra en formas orgánicas y 5% en forma inorgánica.

El yodo se absorbe por medio de los pulmones y el tracto gastrointestinal (Black y. Hounam, 1968; Morgan et al., 1968). El yodo en forma inorgánica es rápidamente absorbido cuando es inalado en vapor o en aerosol. El yodo y el yoduro son reducidos a yoduro en el intestino y después es completamente absorbido en el intestino delgado (Fisher et al., 1965). El yodo absorbido o incorporado se ve reducido por el cigarro, tiocianatos, isotiocianatos, nitratos, fluoruros, calcio, magnesio y hierro (Ubom, 1991). El yodo se elimina del cuerpo en forma de yoduro, >97% es eliminado por la orina y el 1 o 2% es eliminado por las heces (Hays, 2001; Lardsen et al:1998), sin embargo, también puede ser excretado en menor cantidad a través de la saliva, leche materna, sudor, lágrimas y al exhalar.

### 3.3. Yodo en alimentos.

Un problema es la biodisponibilidad de yodo añadido a los alimentos, ya que algunos de ellos pueden contener inhibidores de absorción tales como tiosianatos y sus precursores como los glucosinolatos pueden reaccionar con el yodo y pueden reducir su biodisponibilidad (Moreda et al., 2011).

En países industrializados la fuente más importante del yodo son los productos diarios, tales como: leche de vaca de (27 a 47  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), huevos (93  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), granos y cereales (47  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), en menor proporción en pescado de agua dulce (30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), carne y aves (50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), frutas (18  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (WHO, 1996; Langman, 2002).

El uso del yodo/yodoforos como desinfectantes especialmente en la industria lechera, han contribuido a que esta sea una fuente importante del yodo (Pearce et al., 2004).

#### 4.- Procedimiento Experimental

##### **4.1 Etapas experimentales**

Los experimentos se dividen en 4 etapas:

- 4.1.1 Etapa 1.- Prueba en *Lactuca sativa*, cv. "Great Lakes".
- 4.1.2 Etapa 2.- Prueba en plantas de Tomate.
- 4.1.3 Etapa 3.- Prueba en plántula de lechuga usando hidrogeles (*Lactuca sativa*, cv. "Great Lakes").
- 4.1.4 Etapa 4.- Plántula de tomate usando hidrogeles.

##### **4.2 Variables de medición.**

En cada etapa se llevarán a cabo los siguientes procedimientos experimentales.

###### 4.2.1 Variables agronómicas:

- a) Peso fresco de hojas.
- b) Peso seco de hojas.
- c) Área foliar.
- d) Índice estomático.
- e) Número de hojas.
- f) Incidencia y severidad (Fitotoxicidad) usando la escala de Diener y Ausubel 2005.

###### 4.2.2 Actividad antioxidante:

- a) Actividad antioxidante de 2, 2-Azino-bis 3-ethyl benothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) (ABTS) (Re et al., 1999)
- b) Actividad antioxidante de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Chen et al., 2007)
- c) Contenido de fenoles totales por Folin-Ciocalteu.(Singleton, 1999).
- d) Catalasa (Chance y Maehly, 1955).
- e) Flavonoides (Zhishen et al, 1999).
- f) Superóxido Dismutasa (Kit de Sigma).
- g) Glutación total (reducción de DTNB por Gossett et al., 1994 modificado por Leyva et al., 2011)
- h) Glutación peroxidasa (Flohé y Günzler, 1984, adaptado por Xue et al., 2001).
- i) Ascorbato peroxidasa (Nakano y Asada, 1987).
- j) Clorofila a y b (Munira et al., 2015).
- k) Carotenoides en tomate (Nagata y Yamashita, 1992).

l) Proteínas totales (Bradford, 1976)

#### 4.2.3 Contenido mineral:

##### a) Macroelementos

Nitrógeno

Fosforo

Potasio

Sodio

Calcio

Magnesio

Azufre

##### b) Microelementos

Yodo

Hierro

Flúor

Manganeso

Cobre

Zinc.

### 4.3 Materiales y Procedimientos experimentales

#### 4.3.1 Determinación de actividades enzimáticas (Preparación del extracto enzimático).

Pesar 0.5 g de tejido de hoja homogenizado en 5 ml de buffer de fosfatos 50mM, pH 7.0, conteniendo 1% de polivinilpirrolidona insoluble. La mezcla homogénea fue centrifugada a 15000 g por 10 min y el sobrenadante obtenido fue usado como extracto enzimático. Todos los pasos en la preparación del extracto enzimático serán llevados a cabo entre 0-4°C. — Curva patron?

#### 4.3.2 Actividad antioxidante por ABTS.

Solución stock: Solución de 7 mM ABTS y 2.4 mM de solución de persulfato de potasio/ persulfato de amonio.

La solución stock se prepara al mezclar las soluciones mencionadas en cantidades iguales y se deja reaccionar por 12 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego la solución debe ser diluida y mezclada con 1 mL de ABTS más 60 mL de metanol para obtener una absorbancia de  $0.706 \pm 0.0001$  unidades a 734 nm usando un espectrofotómetro. Se debe preparar solución ABTS para cada ensayo. 1 mL de extracto de planta se deja reaccionar con 1 mL de ABTS y se toma la absorbancia a 734 nm después de 7 min usando un espectrofotómetro.

#### 4.3.3 Actividad antioxidante por DPPH.

Un volumen de 2 mL de muestra, se añade a 2 mL de buffer de fosfatos (0.02 M, pH 6) y 2 mL de 0.2 mM DPPH en

95% de etanol. La mezcla se agito y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente la absorbancia se midió a 517 nm. Una baja absorbancia representa una alta actividad de barrido por DPPH. El porcentaje de barrido se calcula así:  $(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}})/A_{\text{control}} \times 100$ , donde  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia a 517 nm de 0.2 mmol L-1 DPPH y  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia a 517 nm de 0.2 mmol L-1 DPPH con muestra a diferentes concentraciones.

#### 4.3.4 Contenido de fenoles totales.

En 1 mL de muestra, blanco o estándar añadir 60 mL de agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL. Añadir 5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. y mezclar. Después de 1 min y antes de 8 min, añadir 15 ml de solución de carbonato de sodio al 20%, ajustar el volumen a 100 mL y leer el color generado después de 2 h alrededor de 23°C a 760 nm en una celdilla de 1 cm.

#### 4.3.5 Catalasa

La determinación de catalasa se basa en la cuantificación de la tasa de reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la disminución de la absorbancia y la curva de calibración mide concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo tanto, no se lleva a cabo el proceso de reacción en los estándares como en las muestras.

Se prepara una mezcla de reacción de 3 mL, la cual contiene 50 mM de buffer de fosfato, pH 7.0, 15 mM de peróxido de hidrogeno y 25 µL de extracto enzimático. Se toma lectura en tiempo 0 y al minuto a 240 nm. La actividad se expresa en unidades, donde una unidad de catalasa convierte un µmol de peróxido de hidrogeno por minuto.

Determinar la actividad enzimática con la fórmula:

$$U = \frac{\text{Producto o sustrato} * \text{Volumen de reacción} * \text{Tiempo}}{\text{Proteínas totales mg g}^{-1}}$$

Especificando:

$$U = \frac{\text{Resultado de la ecuación de la recta en } \mu\text{moles} * \frac{\text{Volumen total de reacción}}{\text{Volumen de extracto enzimático}} * \frac{1}{\text{Tiempo total de reacción}}}{\text{Proteínas totales mg g}^{-1} \text{ de la misma muestra analizada}}$$

#### 4.3.6 Flavonoides

##### 4.3.6.1 Extracción de flavonoides

Pesar 1 g de hojas previamente secadas en horno o aire seco, extraer con Soxhlet en 100 ml de agua destilada o etanol por una hora y filtrar el extracto. Hojas frescas pesar 1.4 g y cortar en pequeños trozos antes de la extracción.

#### 4.3.6.2 *Determinación de flavonoides.*

Un volumen conocido de extracto se colocará en un matraz de aforación de 10 ml. Se añadirá 5 ml de agua destilada y 0.3 ml de NaNO<sub>3</sub> (1:20). Añadir luego de 5 minutos 3 ml de AlCl<sub>3</sub> (1:10). Después de 6 min, añadir 2 ml de NaOH 1 M y aforar a 10 ml con agua destilada. Mezclar bien la solución y medirla contra un blanco a 510 nm. El contenido de flavonoide será calculado usando una curva de calibración de catequina. Analizar todas las muestras por duplicado o triplicado.

#### 4.3.7 *Glutación total.*

El glutación total está basado en la reducción de 5.5-dithiobis (ácido 2-nitro-benzoico) (DTNB)-glutathion reductasa dependiente se lee a 412 nm contra una curva de GSH. Para el análisis de concentración de GSH, las hojas se homogenizan en 1 ml de 0.2 N HCl. Este extracto se centrifuga a 16000 g por 10 min. Subsecuentemente 500 µl del sobrenadante será neutralizado con 0.2 M de buffer de fosfato de sodio a pH 5.6 y NaOH 0.2 M. Después de neutralizar, el extracto será añadido a la siguiente mezcla de reacción: Buffer de fosfato de sodio 0.2 M, pH 7.5, 10 mM EDTA, NADPH 10 mM, 12 mM DTNB y enzima GR a concentración de 20 U/mL. Los resultados deberán ser expresados como µmol total de GSH g<sup>-1</sup> peso fresco.

#### 4.3.8 *Glutación peroxidasa.*

Para la cuantificación se realiza el mismo procedimiento para el blanco, los estándares de la curva y las muestras.

En un tubo de ensayo:

##### **Para el blanco:**

Añadir 200 µl de buffer de fosfatos.

##### **Para la curva de calibración**

Añadir 200 µl de cada estándar preparado.

##### **Para la medición de muestras**

Agregar 200 µl de extracto enzimático

##### **Extracción**

- \*Adicionar 400 µL de glutathion reducido (0.1 mM) y mezclar.
- \*Añadir 200 µL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.067 M) y mezclar.
- \*Pre calentar en baño de agua a 25 °C por 5 minutos.
- \*Posteriormente agregar 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM) para iniciar la reacción catalítica.
- \*Dejar reaccionar por 10 minutos.
- \*Detener la reacción mediante la adición de 1 mL de ácido tricloro acético al 1%.
- \*Posteriormente colocar esta mezcla en baño de hielo por 30 minutos.
- \*Enseguida centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C.



#### Cuantificación

Tomar 480 µL de sobrenadante y colocar en tubo de ensayo. Agregar 2.2 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.32 M). De igual manera adicionar 320 µL del colorante 5,5 ditio-bis-2 ácido nitro benzoico (1 mM). Leer en espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm (iniciar con el blanco para calibrar equipo).

#### 4.3.9 *Ascorbato peroxidasa.*

La determinación de ascorbato peroxidasa se basa en la cuantificación de la tasa de oxidación del ascorbato mediante la disminución de la absorbancia y la curva de calibración mide concentraciones conocidas de ácido ascórbico, por lo tanto, no se lleva a cabo el proceso de reacción en los estándares como en las muestras.

Ensayo enzimático- La actividad ascorbato peroxidasa se determina usando una mezcla de reacción de (1 mL\*) conteniendo 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.0), 0.1 mM de peróxido de hidrogeno y 0.5 mM de ascorbato. La oxidación de ascorbato dependiente de peróxido de hidrogeno se midió a 290 nm en tiempo cero y a 1 minuto.

La mezcla (1 mL\*) para el donador específico de peróxido contiene 50 mM de fosfato de potasio (pH 7.0), 0.1 mM de peróxido de hidrogeno y uno de los siguientes donadores: 1 mM GSH, 0.15 mM NAD(P)H (340 nm, 6.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), 10 µM Cys c (550 nm debido a la forma reducida, 19 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), 20 mM guaiacol (470 nm debido al purpurogalin, 26.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) o ascorbato 0.5 mM (290 nm, 2.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

#### 4.3.10 *Contenido de clorofila a y b.*

Pesar 1 g de material vegetal fresco, homogeneizar en mortero. Agregar 5 ml de acetona al 90% y re-homogeneizar, adicionar una pizca de carbonato de magnesio (para proteger y estabilizar las clorofilas). Tomar 2 mL de la mezcla y colocarlo en tubo eppendorf. Centrifugar por 5 minutos a 10 000 rpm a 4°C. Extraer el sobrenadante y leer absorbancias de clorofila 'a' y 'b' a 663 y 645 nm, respectivamente. Se utiliza 90% de acetona en blanco.

El contenido total de clorofila se expresará como mg g<sup>-1</sup>, y será determinado usando las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = 25.38 \cdot A_{663} + 3.64 \cdot A_{645}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = 30.38 \cdot A_{645} - 6.58 \cdot A_{663}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = 18.8 \cdot A_{663} + 34.02 \cdot A_{645}$$

#### 4.3.11 *Carotenoides.*

Se pesa 0.1 g de tomate liofilizado los cuales se mezclan con 20 mL de una solución de hexano: acetona (3:2). Del sobrenadante se toma una alícuota y se mide a 453, 505, 645 y 663 nm (espectrofotómetro). El contenido de licopeno y β-caroteno se estimó utilizando las ecuaciones: Licopeno (mL/100g) = -0.0458 x A<sub>663</sub> + 0.204 x A<sub>645</sub> + 0.372 x A<sub>505</sub> - 0.0806 x A<sub>453</sub>; β-caroteno (mL/100g) = 0.216 x A<sub>663</sub> - 1.22 x A<sub>645</sub> - 0.304 x A<sub>505</sub> + 0.452 x A<sub>453</sub>. Los resultados se expresan en mg/100g de peso fresco (PF).

4.3.12 *Proteínas totales.*

Extracción de Proteínas.

Para poder realizar la prueba de ELISA se requería previamente hacer una extracción de proteínas (Boursiac et al., 2005; Santoni et al., 2003), la cual se describe a continuación:

Pesar raíz u hoja (0.4-0.8 g de peso fresco) triturar usando un mortero y nitrógeno líquido. El polvo resultante fue incubado con 1 ml de 10% ácido tricloroacético, 0.07% β-mercaptoetanol en acetona por 30 min a -20°C y posteriormente centrifugado a 4°C por 10 min a 13500 rpm. El pellet fue lavado dos veces con acetona, 0.07% β-mercaptoetanol, y resuspendido en 1mL/mg de un buffer lisis (9M urea, 0.5% triton X-100, 65mM dithiothreitol). Después de 30 min bajo agitación, el extracto fue centrifugado por 20 min a 12000 y el sobrenadante contiene las proteínas totales recobradas.

Si la muestra contiene entre 10 y 100 µg de proteína. Tomar un volumen de 0.1 mL de muestra o de blanco y colocar en tubo de 12 x 100 mm. Añadir 5 mL de reactivo de proteína Bradford y mezclar por vortex. Medir a una absorbancia de 595 nm medir después de 2 min y antes de 1 h, para el blanco colocar buffer y 5 mL del reactivo. Para medir la cantidad de proteína presente en la muestra hacer una curva de calibración, usando como estándar albumina sérica bovina (BSA).

4.3.12 *Contenido de minerales.*

Para la determinación de cada muestra se deben secar hasta cenizas a 550 °C por alrededor de 7h. Las cenizas deben ser disueltas en 10 HCl en un crisol o matraz cónico. La solución debe ser filtrada en un matraz de aforación y llevar al aforo a 100 mL de agua destilada.

La determinación de microelementos y macroelementos se llevarán a cabo con la técnica de digestión ácida descrita por Fick et al., 1976.

Para la determinación de yodo se realizara con la técnica de digestión alcalina descrita por Cortés et al., 2016.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Etapa 1. Pruebas experimentales con el complejo líquido en lechuga y análisis estadístico.	x	x	x	x								
Escritura y envío de artículo científico.						x	x	x	x	x		
Etapa 2. Pruebas experimentales con el complejo líquido en tomate y análisis estadístico.				x	x	x	x	x	x	x	x	x

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Etapa 1. Pruebas experimentales en lechuga y análisis estadístico.	x	x										
Etapa 2. Pruebas en tomate y análisis estadístico.	x	x										

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2020
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

## 6.-Literatura Citada

Anguiano, B., and Aceves, C. (2011). Iodine in mammary and prostate pathologies. *Curr. Chem. Biol.* 5, 177–182. doi:10.2174/187231311796765049

A. o. S. Institute of Medicine, in Dietary reference intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc, National Academy Press, Washington, DC, 2001.

Aranda, N., Sosa, S., Delgado, G., Aceves, C., and Anguiano, B. (2013). Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in Differentiated and un differentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate* 73, 31–41. doi: 10.1002/pros.22536

B. de Benoist, E. McLean, M. Andersson, L. Rogers, *Food Nutr. Bull.* 2008, 29, 195 – 202.

Black, A., & Hounam, R. F. (1968). Penetration of iodine vapour through the nose and mouth and the clearance and metabolism of the deposited iodine. *Annals of Occupational Hygiene*, 11(3), 209-225.

Blasco, B., Leyva, R., Romero, L., and Ruiz, J.M. (2013). Iodine effects on phenolic metabolism in lettuce plants under salt stress. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2591–2596. doi:10.1021/jf303917n

Blasco, B., Rios, J.J., Cervilla, L.M., Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J.M., and Romero, L. (2008). Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for Cultivation and human health. *Ann. Appl. Biol.* 152, 289–299. doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00217.x.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Cortés-Flores, C., M.N. Rodríguez-Mendoza, A. Benavides-Mendoza, J.L. García-Cué, M. Tornero-Campante, P. Sánchez-García. (2016). Iodine increases the growth and mineral concentration in sweet pepper seedlings. **Agrociencia** 50:747-758

Chance, R., Baker, A. R., Küpper, F. C., Hughes, C., Kloareg, B., & Malin, G. (2009). Release and transformations of inorganic iodine by marine macroalgae. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 82(3), 406-414.

Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology*, 2, 764-775.

Chen, H. Y., Lin, Y. C., & Hsieh, C. L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food chemistry*, 104(4), 1418-1424.

De Benoist, B., McLean, E., Andersson, M., & Rogers, L. (2008). Iodine deficiency in 2007: global progress since 2003. *Food and nutrition bulletin*, 29(3), 195-202.

Diener, A. C., & Ausubel, F. M. (2005). RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics*, 171(1), 305-321.

Dixneuf, S., Ruth, A. A., Vaughan, S., Varma, R. M., & Orphal, J. (2009). The time dependence of molecular iodine emission from Laminaria digitata. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 9(3), 823-829.

Fick KR, Miller SM, Funk JD, McDowell LR, Houser RH. (1976). Methods of mineral analysis for plant and animal tissues. Methods of mineral analysis for plant and animal tissues. University of Florida, Institute of Food and Agriculture, Department of Animal Sciences: Gainesville, FL USA.

Fischer, H. W. (1965). The excretion of iodipamide: relation of bile and urine outputs to dose. *Radiology*, 84(3), 483-

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 105, 114-120.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization. (2005). Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edn, Geneva, pp. 303–317.

Fuge, R., and Johnson, C. C. (2015). Iodine and human health, the role of environmental geochemistry and diet, a review. *Appl. Geochem.* 63, 282–302. doi:10.1016/j.apgeochem.2015.09.013.

García-Osuna, H. T., Benavides-Mendoza, A., Rivas-Morales, C., Morales-Rubio, E., Verde-Star, J., and Miranda-Ruvalcaba, R. (2014). Iodine application increased ascorbic acid content and modified the vascular tissue in *Opuntia ficus-indica*. *Pak. J. Bot.* 46, 127–134. Available online at: [http://www.pakbs.org/pjbot/abstracts/46\(1\)/13.html](http://www.pakbs.org/pjbot/abstracts/46(1)/13.html).

Gossett, D. R., Millhollon, E. P., Cran Lucas, M. (1994). Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop. Sci.* 34, 706–714.

Hageman, R. H., Hodge, E. S., & McHargue, J. S. (1942). Effect of potassium iodide on the ascorbic acid content and growth of tomato plants. *Plant physiology*, 17(3), 465.

Hays, M. T. (2001). Estimation of total body iodine content in normal young men. *Thyroid*, 11(7), 671-675.

Hong, C.-L., Weng, H.-X., Qin, Y.-C., Yan, A.-L., and Xie, L.-L. (2008). Transfer of iodine from soil to vegetables by applying exogenous iodine. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 575–583. doi:10.1051/agro:2008033.

Hurtevent, P., Thiry, Y., Levchuk, S., Yoschenko, V., Henner

International Commission on Radiological Protection, The ICRP Database of Dose Coefficients: Workers and Members of the Public, Stockholm, 2001.

Jones, C. E., Hornsby, K. E., Sommariva, R., Dunk, R. M., von Glasow, R., McFiggans, G., et al. (2010). Quantifying the contribution of marine organic gases to atmospheric iodine. *Geophys. Res. Lett.* 37, 1–6. doi: 10.1029/2010gl043990.

Kaltsayannis, N., and Plane, J. M. (2008). Quantum chemical calculations on a selection of iodine-containing species (IO, OIO, INO, I<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and I<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) of importance in the atmosphere. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(13), 1723-1733.

Küpper, F. C., Carpenter, L. J., McFiggans, G. B., Palmer, C. J., Waite, T. J., Boneberg, E.-M., et al. (2008). Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6954–6958. doi:10.1073/pnas.0709959105.

Langman, M. (Chairman) (2002). Expert Group on Vitamins and Minerals, Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals.

Lawson PG, Daum D, Czauderna R, Meuser H and Härtling JW (2015) Soil versus foliar iodine fertilization as a biofortification strategy for field-grown vegetables. *Front. Plant Sci.* 6:450. doi: 10.3389/fpls.2015.00450.

Leyva, R., Sánchez-Rodríguez, E., Ríos, J. J., Rubio-Wilhelmi, M. M., Romero, L., Ruiz, J. M., et al. (2011). Beneficial effects of exogenous iodine in lettuce plants subjected to salinity stress. *Plant Sci.* 181, 195–202. doi:10.1016/j.plantsci.2011.05.007.

Manley, S. L., & de la Cuesta, J. L. (1997). Methyl iodide production from marine phytoplankton cultures. *Limnology and Oceanography*, 42(1), 142-147.

Medrano-Macías J, Leija-Martínez P, González-Morales S, Juárez-Maldonado A, Benavides-Mendoza A. (2016). Use of iodine to biofortify and promote growth and stress tolerance in crops. *Front Plant*

- Miyake, Y., & Tsunogai, S. (1963). Evaporation of iodine from the ocean. *Journal of Geophysical Research*, 68(13), 3989-3993.
- Moore, R. M., Webb, M., Tokarczyk, R., & Wever, R. (1996). Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 101(C9), 20899-20908.
- Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., & Bermejo-Barrera, P. (2011). A review on iodine speciation for environmental, biological and nutrition fields. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(11), 2107-2152.
- Moore, R.M., and Groszko, W. (1999). Methyl iodide distribution in the ocean and fluxes to the atmosphere. *J. Geophys. Res. Ocean*. 104, 11163–11171. doi: 10.1029/1998JC900073.
- Morgan, A., Morgan, D. J., & Black, A. (1968). A study of the deposition, translocation and excretion of radioiodine inhaled as iodine vapour. *Health physics*, 15(4), 313-322.
- Munira, S., Hossain, M. M., Zakaria, M., Ahmed, J. U., & Islam, M. M. (2015). Evaluation of potato varieties against salinity stress in Bangladesh. *International Journal of Plant and Soil Science*, 6(2), 73-81.
- Nagata, M., & Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(10), 925-928.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and cell physiology*, 28(1), 131-140.
- O'dowd, C. D., Jimenez, J. L., Bahreini, R., Flagan, R. C., Seinfeld, J. H., Hämeri, K., and Hoffmann, T. (2002). Marine aerosol formation from biogenic iodine emissions. *Nature*, 417(6889), 632-636.
- Pearce, E.N., Pino, S., He, X., Bazrafshan, H. R., Lee, S. L. and Braverman, L. E. (2004). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 3421–3424.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Saiz-Lopez, A., & von Glasow, R. (2012). Reactive halogen chemistry in the troposphere. *Chemical Society Reviews*, 41(19), 6448-6472.
- Sillen, L. G. (1961). The physical chemistry of seawater. In *Oceanography* (Sears, M., ed.) American Association for Advancement of Science, Washington D.C., pp. 549-581.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Smolen, S., Wierzbinska, J., Sady, W., Kołton, A., Wiszniewska, A., and Liszka Skoczylas, M. (2015). Iodine biofortification with additional application of salicylic acid affects yield and selected parameters of chemical composition of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *Sci.Hortic.* 188, 89–96. doi: 10.1016/j.scienta.2015.03.023.
- Ubom, G. A. (1991). The goitre-soil-water-diet relationship: case study in Plateau State, Nigeria. *Science of the total environment*, 107, 1-11.
- U. N. C. s. F. World Health Organization, International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders, Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination: A guide for programme managers, 3rd ed., World Health Organization, Geneva, 2007.

Underwood. E, J., (1977). Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Academic Press, New York.

Weng, H.-X., Liu, H.-P., Li, D.-W., Ye, M., Pan, L., and Xia, T.-H. (2014). An innovative approach for iodine supplementation using iodine-rich phytogetic food. *Environ. Geochem. Health.* 36, 815–828. doi: 10.1007/s10653-014-9597-4 doi: 10.1007/s10653-014-9597-4.

Weng, H.-X., Weng, J.-K., Yong, W.-B., Sun, X.-W., and Zhong, H. (2003). Capacity and degree of iodine absorbed and enriched by vegetable from soil. *J. Environ. Sci. (China)* 15, 107–111.

Wong, G.T.F. 1991. The marine geochemistry of iodine. *Rev. Aquatic Sci.* 4: 45-73.

World Health Organization (2007). Iodine deficiency in Europe: A continuing public health problem. Geneva: WHO Press.

World Health Organization. (1996). Trace Elements in Human Nutrition and Health, Geneva.

World Health Organization, UNICEF and International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorder. (2001). WHO, WHO/Euro/NUT, Geneva, pp. 1–107.

Xue, T., Hartikainen, H., & Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, 237(1), 55-61.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.

Zimmermann MB, Jooste PL, Pandav CS (2008). Iodine-deficiency disorders. *Lancet* 372 (9645):1251–1262. doi:10.1016/s0140-6736(08)61005-3.