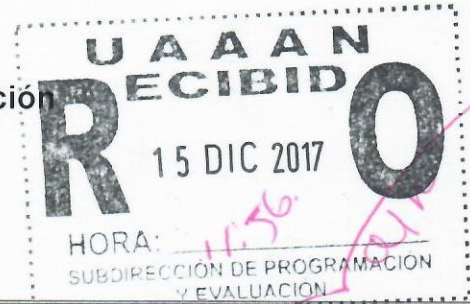




Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Botánica
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología				
Línea de investigación:	Biotecnología Aplicada				
Título del proyecto:	Incremento en la eficacia en la aplicación de compuestos bioactivos en suelo usando alginato como agente encapsulante.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$40,000.00	El proyecto es:	Nuevo	<input checked="" type="checkbox"/>	Continuación
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	<input checked="" type="checkbox"/>	Tecnológica	e-mail del responsable: erika_rivas257@outlook.com
Vinculación:	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):	CIQA				
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo				
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2020				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez	Botánica (3614)	3923		
Colaborador:	Dra. Adalberto Benavides Mendoza	Horticultura (3612)	3303		
Colaborador:	Dra. Silvia Yudith Martínez Amador	Botánica (3614)	3796		
Colaborador:	Dra. Hermila Trinidad García Ozuna	Fitomejoramiento (0203)	4220		
Colaborador:	Dra. Julia Rosa Medrano Macias	UANL			
Colaborador:	Dra. Ileana Vera reyes	CIQA			
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	POR ASIGNAR				
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
	Vo. Bo.		Autoriza		
Firma y sello	Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" 				
Nombre	Jefe de Departamento Dep. de Botánica		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Incremento en la eficacia de la aplicación de compuestos bioactivos en suelo usando alginato como agente encapsulante.

\$40,000.00

2.- Introducción

El tomate (*Solanumlycopersicom* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes del mundo, ya que es uno de los hortalizasmás consumidos en el mundo y juega un papel importante en la dieta humana. Sin embargo, el cultivo de tomate está frecuentemente expuestos a múltiples factores ambientales que afecta el desarrollo de la planta o la calidad del fruto obtenido, ocasionando importantes pérdidas del fruto o de la planta completa.

Con la finalidad de reducir dichas pérdidas es importante implementar técnicas que permitan una resistencia mayor a la planta contra condiciones adversas del medio ambiente (abióticas), así como contra el ataque de organismos patógenos (bióticos), lo cual traerá una mayor calidad y rendimiento en el cultivo de tomate. Se ha demostrado que la aplicación de compuestos bioactivos e incluso minerales, incrementa la fisiología de la planta, y por lo tanto hay una mejora en la morfología de esta. Sin embargo, uno de los problemas más comunes al aplicar estos compuestos es su interacción con el medio donde es aplicado, produciéndose la pérdida de la función o la degradación del compuesto, es por ello que en los últimos años se han implementado técnicas de inmovilización (encapsulación) de compuestos bioactivos para prolongar la estabilidad y disponibilidad de éstos con la finalidad de que se prolongue el tiempo en el que éste puede ser utilizado por la planta. Dentro de las matrices más utilizadas se encuentra la formada por las sales de alginato (calcio-alginato), la cual ha sido utilizada no solo para inmovilizar compuestos bioactivos, sino también enzimas y microorganismos.

Conforme a lo anterior, en el presente proyecto se propone la inmovilización (encapsulación) de una fitohormona (ácido salicílico) en una matriz de calcio-alginato, para posteriormente ser aplicada en un sustrato en el cual se desarrollará un cultivo de tomate con y sin estrés para proporcionar a la planta un enriquecimiento exógeno de esta fitohormona e incrementar el mecanismo de defensa vegetal contra factores bióticos o abióticos a los que se pueda exponer la planta de tomate y con ello mejorar la calidad del cultivo. Se determinará las variables de crecimiento y productividad del cultivo, así como, el potencial antioxidante total y enzimático, la acumulación de ácido salicílico para comprobar el efecto de la aplicación del compuesto bioactivo inmovilizado.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Inmovilizar compuestos bioactivos en una matriz de calcio-alginato para evitar su degradación o interacción con factores encontrados en el sustrato, con la finalidad de prolongar su disponibilidad y función al ser aplicados en cultivos de plantas de tomate (*Solanumlycopersicom*L.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Etapa I (Año 2018)

- Inmovilizar y caracterizar el tipo de inmovilización de un compuesto bioactivo (ácido salicílico) en una matriz calcio-alginato.
- Aplicación del compuesto bioactivo encapsulado (ácido salicílico) en el sustrato usado para el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate.
- Evaluar la concentración del ácido salicílico en plántulas de tomate.
- Determinar el potencial antioxidante total, la biomasa y variables de crecimiento en las plántulas de tomate con aplicación del compuesto bioactivo encapsulado.

Etapa II(Año 2019)

- Aplicación del compuesto bioactivo encapsulado (ácido salicílico) en el sustrato usado para el crecimiento y desarrollo de plantas adultas de tomate.
- Determinar la biomasa y variables de crecimiento en las plantas adultas de tomate con aplicación del compuesto bioactivo encapsulado.
- Determinar el potencial antioxidante total y la actividad antioxidante enzimática (SOD, CAT, GPX).

2

- Evaluar la productividad del cultivo de tomate.
- Evaluar la concentración del ácido salicílico en plantas adultas de tomate.

Etapa III(Año 2020)

- Determinar si hay resistencia a patógenos en plantas de tomate sometidas a un tratamiento con aplicación de ácido salicílico encapsulado.
- Determinarla biomasa y variables de crecimiento en las plantas de tomate sometidas a estrés biótico con aplicación del compuesto bioactivo encapsulado.
- Evaluar la productividad del cultivo de tomate.
- Cuantificar el potencial antioxidante total y actividad antioxidantes enzimáticos (CAT, SOD, GPX) en plantas de tomate sometidas a estrés biótico.
- Evaluar la concentración del ácido salicílico en las raíces, hojas, tallos y frutos de las plantas de tomate sometidas a estrés biótico.

Hipótesis

La inmovilización de compuestos bioactivos(ácido salicílico) en una matriz de calcio-alginato proporciona al compuesto protección contra las condiciones adversas del medio ambiente, incrementando la eficiencia de la aplicación del compuesto en un sustrato al mantenerse estable y disponible por más tiempo para ser aprovechado por la planta ante la presencia de un estrés biótico o abiótico.

3.-Revisión de Literatura

TOMATE(*Solanumlycopersicom* L.)

El tomate (*Solanumlycopersicom* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes del mundo, ya que es uno de los hortalizasmás consumidos en el mundo y juega un papel importante en la dieta humana (Ali y Ismail, 2014). Además esta hortaliza ha servido durante mucho tiempo como un sistema modelo para la genética de las plantas, el desarrollo, la fisiología y la patología, dando lugar a información sustancial sobre la biología de este organismo económicamente importante (Faurobert et al., 2007). Sin embargo, los tomates están frecuentemente expuestos a múltiples tensiones ambientales. En particular, la salinidad es una de las limitaciones ambientales más importantes que afectan el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas (Dasgan et al., 2002; Juan et al., 2005; Gunes et al., 2007; Khan et al., 2010). Lo anterior, ha ocasionado que en países en vía de desarrollo, las pérdidas en frutas y hortalizas durante la poscosecha se ubiquen entre 20% y 50% (Kader, 1992; Casierra y Aguilar, 2008), siendo las modificaciones más sobresalientes en la calidad de los tomates que pueden ser de naturaleza mecánica, fisiológica o patológica (Casierra y Aguilar, 2008). Para reducir dichas pérdidas es importante implementar técnicas que permitan una resistencia mayor a la planta contra condiciones adversas del medio ambiente (abióticas), así como contra el ataque de organismos patógenos (bióticos), lo cual traerá una mayor calidad y rendimiento en el cultivo de tomate. Se ha demostrado que la aplicación de compuestos bioactivos e incluso minerales, incrementa la fisiología de la planta, y por lo tanto hay una mejora en la morfología de esta. Sin embargo, uno de los problemas más comunes al aplicar estos compuestos es su interacción con el ambiente donde es aplicado, produciéndose la pérdida o el degradación del compuesto. Por tal razón, en los últimos años se han implementado técnicas de inmovilización (encapsulación) de compuestos bioactivos en diversas matrices conformadas por una amplia variedad de agentes inmovilizantes solos o combiandos, con la finalidad de prolongar la estabilidad y disponibilidad de éstos compuestos. Dentro de las matrices más utilizadas se encuentra la formada por las sales de alginato (calcio-alginato), la cual ha sido utilizada no solo para inmovilizar compuestos bioactivos, sino también enzimas y microorganismos (Gombotz y Wee, 1998; Burgain et al., 2011).

ÁCIDO SALICILICO

El ácido salicílico (SA) se encuentra en las plantas de forma natural, y tiene un papel importante relacionado con el proceso de crecimiento, así como también participa en los procesos relacionados a la fotosíntesis al mejorar la actividad de los cloroplastos, absorción y transporte de nutrientes, incrementar la actividad de enzimas antioxidantes,

provocar cambios en la anatomía de las plantas e incrementar el rendimiento (Khanet *al.*, 2010; Purcarea y Cachita-Cosma, 2010).

Sin embargo una de las funciones más importantes del ácido salicílico radica en que es un compuesto señalizador envuelto en señales internas que regulan la respuesta de la defensa de las plantas contra condiciones bióticas haciendo referencia a plagas y enfermedades, al estimular la formación de sustancias que repelen a los herbívoros, atraen a sus enemigos naturales, estimulan la formación de sustancias que inhiben o provocan la muerte de las células dañadas o dañinas, presenta influencia directa entre H_2O_2 y glutatión (GSH) para generar homeostasis redox dentro de la célula (Girlinget *al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), y abióticas como temperatura, sales, exceso o falta de humedad, etc., al incrementar los niveles de enzimas antioxidantes, elevar el nivel endógeno de hormonas, inducir la aparición de proteínas de defensa, entre otras acciones (Wang *et al.*, 2010), alterando en primera instancia la composición bioquímica de la célula seguida de cambios genéticos (Mustafaet *al.*, 2009).

Debido a que en algunos casos las deficiencias de compuestos bioactivos dentro de un sistema vegetal o a la necesidad de activar un proceso fisiológico se ha incrementado la aplicación exógena de éstos. En el caso del ácido salicílico cuando es aplicado de forma exógena se han reportado que genera cambios en las concentraciones de los compuestos celulares que conducen a una adaptación de la planta ante un factor adverso (biótico o abiótico), mejor desarrollo de planta y rendimiento (Benavides-Mendoza *et al.*, 2004; Purcarea y Cachita-Cosma, 2010).

Existe gran cantidad de reportes donde se han determinado los cambios en las concentraciones de moléculas o compuestos internos, así como procesos y funciones de las plantas como respuesta a la aplicación de AS en diversas formas, dosis y cultivos (Ahsrafet *al.*, 2010),

Szepesi (2006) observó en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) que al aplicar al medio de cultivo AS a 10^{-4} y 10^{-7} (0.1 y 0.0001 mM) previo a una condición salina (100 mM de NaCl) se acumulaban una mayor concentración de osmólitos compatibles, lo cual mejoraba la eficiencia fotosintética de la planta, la actividad de la ascorbatoperoxidasa y el contenido de carotenoides y poliaminas. Este autor también observó que al aplicar al medio de cultivo AS a 10^{-4} y 10^{-7} (0.1 y 0.0001 mM) durante tres semanas previas a la condición salina (100 mM de NaCl) se incrementaba la actividad de SOD y CAT.

Gemeset *al.* (2008) también utilizó la planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) para evaluar la aplicación de ácido salicílico al medio de cultivo (0.1 mM) de forma previa a un factor de estrés como lo podría ser la salinidad (100 mM) reportando un incremento de prolina, pigmentos fotosintéticos y carbohidratos solubles cuando dicho factor se presentó, lo que indica que se mejoró la adaptación de la planta ante un factor adverso de estrés abiótico.

En el caso del papel del ácido salicílico contra el estrés biótico, existen reportes que indican que al ser aplicada esta fitohormona en plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Pseudomonas syringae* se observa un incremento en las proteínas relacionadas con la patogénesis y en la vía secretora de la planta (Zhenget *al.*, 2015).

AGENTES INMOVILIZANTES

Según las propiedades del compuesto que se va a inmovilizar (encapsular) y el propósito de la encapsulación, los agentes utilizados se basan en proteínas (como zeína, soja, colágeno y gelatina), polisacáridos (como derivados de celulosa, almidón, alginato y quitosano) y lípidos (tales como ésteres de glicerol y ceras), que pueden usarse solos o en combinación.

La funcionalidad de estos materiales puede variar, ya que cada componente ofrece diferentes propiedades a la matriz compuesta. De hecho, las propiedades mecánicas y de barrera de estas películas no solo dependen de los compuestos utilizados en la matriz del polímero, sino también de su compatibilidad y de las fuerzas de cohesión, incluyendo enlaces covalentes, enlaces iónicos y enlaces H, entre moléculas de polímero formadoras de recubrimiento (Janjarasskul y Krochta 2010).

Ventajas AGENTES INMOVILIZANTES

Teniendo en cuenta algunas de las desventajas de los compuestos bioactivos, las matrices de encapsulado son capaces de ofrecer protección contra el medio ambiente (temperatura, humedad, calor, gas (oxígeno), rayos UV), mejorando la solubilidad y controlando la liberación del compuesto (**Figura 1**).

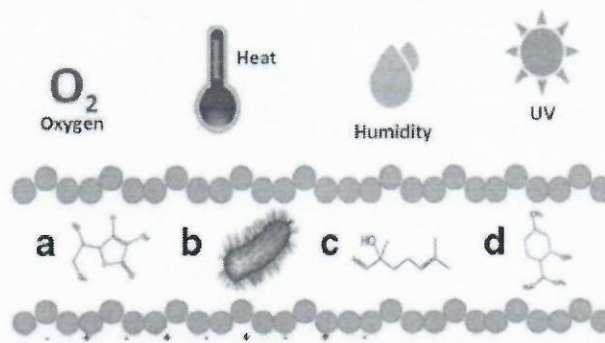


Figura 1. Matriz que provee protección a una antioxidante (a), bacteria(b), compuesto antimicrobiano (c), compuestos fenólicos (d) contra factores medioambientales.

ALGINATO

Alginatos o algina es un término genérico para las sales y derivados del ácido algínico que se derivan principalmente de algas pardas (Phaeophyceae) (King, 1983; Bureyet *al.*, 2008). Los alginatos son polímeros aniónicos no ramificados lineales compuestos de regiones homopoliméricas de 1,4- β -D-ácido manurónico (Bloques M) y α -L-ácidiogulurónico (Bloques G)(Figura 2), intercalados con regiones de estructura alterna (Rowe, 2009).

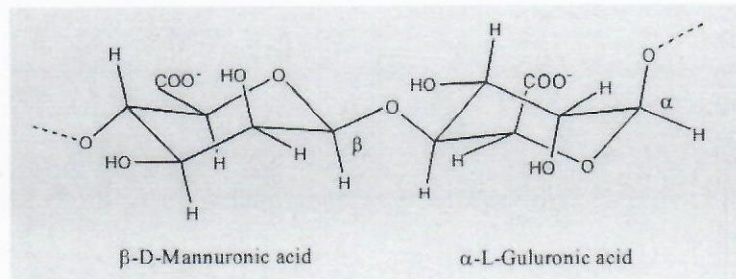


Figura 2. Estructura del alginato (unidades de ácido manurónico y ácido gulurónico).

La manufactura industrial de alginato se basa en la extracción del polímero a partir de algas pardas. Las algas en la naturaleza crecen principalmente en áreas templadas, pero también se cultivan grandes cantidades en otras regiones como el Lejano Oriente, la costa de China o Japón. Las algas marinas se extraen con una solución alcalina diluida que solubiliza el ácido algínico presente. Se obtiene ácido algínico libre tratando el material viscoso resultante con ácidos minerales, y luego se convierte en una sal. La proporción de residuos M y G depende de las especies de algas marinas a partir de las cuales se aísla el ácido algínico. La secuencia de los residuos M y G varía entre especies y probablemente dentro de cadenas poliméricas únicas, en función de los tipos de secuencias (Bureyet *al.*, 2008).

Los alginatos están disponibles comercialmente como sales de sodio, potasio o amonio y se producen en una gama de grados de viscosidad de tamaños de malla y niveles de calcio para proporcionar funcionalidades específicas (Bureyet *et al.*, 2008).

Los alginatos se pueden preparar con una amplia gama de pesos moleculares (60,000-700,000 Daltons) dependiendo de la aplicación (Draget *et al.*, 1994).

USOS DE LAS ASLES DE ALGINATO

El alginato ha sido utilizado como encapsulante material debido a su capacidad de absorber agua, para ser fácil manipulado e inocuidad, teniendo también otras características tales como: gelificación, estabilización y espesamiento, razones que han sido de gran interés para la industria alimentaria (Goh *et al.*, 2012). Es el polisacárido más utilizado como material encapsulante de bacterias del ácido láctico, debido a la facilidad de manejo, naturaleza no tóxica y bajo costo, además de aumentar la viabilidad de estas bacterias cuando se las expone a diferentes condiciones cuando se comparan con bacterias no encapsuladas (Burgain *et al.*, 2011).

El ácido algínico u sus sales de sodio y calcio son no tóxicas y biocompatibles, por lo que son ampliamente usadas en la industria médica, farmacéutica, cosméticas y alimentaria (Gombotz y Wee, 1998).

Alginato de sodio como agente encapsulante (Araújo et al., 2014)

La gelificación de las sales de alginato ocurre por interacción entre los cationes y los residuos de ácido gulurónico (Douglas y Tabrizian, 2005). La cinética de la gelificación de alginato puede verse afectada por la temperatura a la que se produce la gelificación, así como por la concentración de alginato y la concentración de iones (Draget, 2000). La gelificación ocurre cuando se produce una zona de unión entre los bloques de ácido α -L-gulurónico (G) de una molécula de alginato que está físicamente conectada a otro bloque de ácido α -L-gulurónico (G) de otra molécula de alginato por calcio iones. La vista previa de la estructura se llama modelo de caja de huevos (Figura 3)(Draget, 2000).

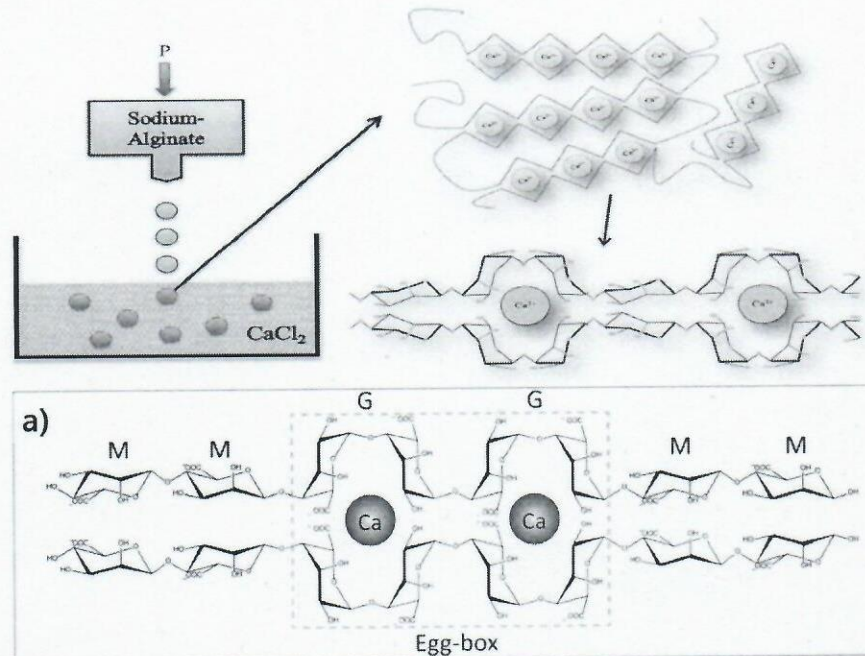


Figura 3. Modelo de caja de huevos formada al unirse las unidades ácido α -L-gulurónico (G) del alginato con el calcio.

El alginato se puede gelificar rápidamente en presencia de iones de calcio no secuestrados y, por lo tanto, la capacidad para controlar la introducción de estos iones de entrecruzamiento es importante. Como resultado, el método de configuración interna puede ser más atractivo a menos que un núcleo rígido de partículas y centro de líquido es deseado (Draget, 2000). Las concentraciones de gelificación utilizadas habitualmente para alginato son del 1-2% p / p (Blandino et al., 1999; Liu et al., 2003).

Las micropartículas de alginato de calcio se preparan generalmente por dos métodos: método de extrusión goteando una solución de alginato de sodio en una solución de una sal de calcio, lo que conduce al fenómeno de gelificación iónica externa; y el método de emulsificación, para la gelificación iónica interna de alginato en una emulsión de agua / aceite (Gombotz y Wee., 1998).

Gelificación iónica externa

La gelificación iónica externa se produce utilizando la técnica de extrusión. En esta técnica, los microorganismos, enzimas o compuesto bioactivo se agregan a una solución de alginato y se incorporan inmediatamente en forma de gotas en una solución de cloruro de calcio al endurecimiento (Yeo et al., 2001). La interacción de los iones, como Ca^{2+} , con los grupos carboxilo de las cadenas poliméricas del alginato da como resultado la formación de un gel insoluble (Srnec et al., 2008).

Las partículas producidas por extrusión presentan típicamente diámetros que varían de 500 μm a 3 mm, y el tamaño de las partículas formadas depende del tamaño del diámetro de la aguja utilizada para gotear la solución, la

viscosidad y la concentración de la solución de alginato, además de la distancia entre la jeringa y la solución de cloruro de calcio (Bureyet *al.*, 2008)

TIPOS DE MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

En general los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías, estas categorías son: retención física (**Figura 3**) y unión química (**Figura 4**).

RETENCIÓN FÍSICA

Este método de inmovilización se divide en dos clases: *retención física por "atrapamiento"* y *en retención física por "inclusión en membranas"*(Figura 3).

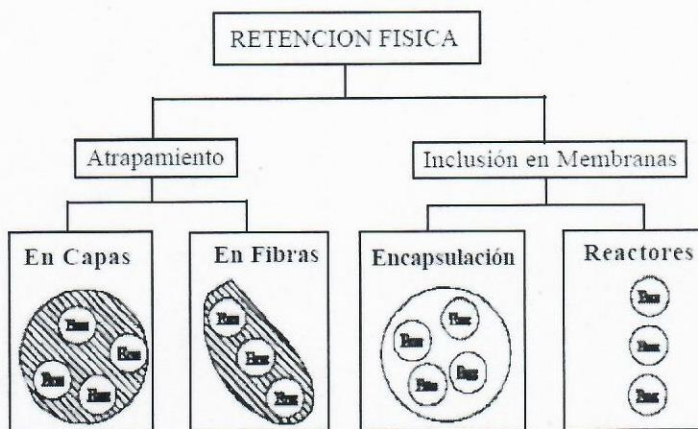


Figura 3. Métodos de inmovilización (Arroyo, 1998).

Retención física por atrapamiento

La retención física por "atrapamiento" se divide a su vez en: *atrapamiento en capas* y *atrapamiento en fibras*. El "atrapamiento" consiste en la retención física de un compuesto, enzima o microorganismo en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoencruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato y resinas de poliuretano. El atrapamiento puede ser en "geles" o "fibras". En el primer caso la enzima queda atrapada en el interior del gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microvellosidades de una fibra sintética (Arroyo, 1998).

Retención física por inclusión en membranas

La retención física por "inclusión en membranas" se divide a su vez en: *encapsulación*, *microencapsulación* y *reactores de membrana* (Arroyo, 1998).

- La **encapsulación** es un proceso fisicoquímico o mecánico para atrapar una sustancia en un material con el fin de producir partículas con diámetros de unos pocos nanómetros a unos pocos milímetros (Chen y Chen, 2007). La encapsulación de componentes bioactivos se puede utilizar en muchas aplicaciones en la industria alimentaria: controlando la reacción oxidativa, enmascarando sabores, colores y olores, proporcionando una liberación sostenida y controlada, ampliando la vida útil, etc
- En la "**microencapsulación**" el compuesto, enzima o microorganismo es rodeado de membranas semipermeables. Estas membranas semipermeables pueden ser permeables (originadas por una polimerización interfacial) o no permeables (generadas por surfactantes, también llamadas "micelas

reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

- En el caso de “**reactores de membrana**” se han desarrollado reactores o sistemas en los que se logra contener a la compuesto, enzima o microorganismo atrapados, dichos reactores emplean membranas permeables. Mediante una bomba se establece el flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor.

UNIÓN QUÍMICA

La unión química se da por “**unión a soportes**” o por “**reticulado**”(Figura 4).

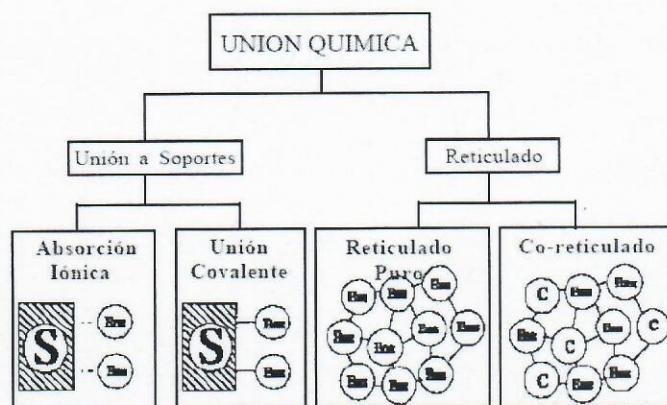


Figura 4. Métodos de inmovilización de enzimas por “unión química” (Arroyo, 1998).

Unión a soportes

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del compuesto, enzima o microorganismo. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes, los cuales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más comúnmente en forma de esferas (Arroyo, 1998).

Los soportes pueden clasificarse en dos grupos:

- 1.- **Soportes inorgánicos.** Dentro de este grupo se tiene una gran variedad de soportes, que pueden ser “naturales” o “materiales manufacturados”.
- 2.- **Soportes orgánicos.** Los cuales se pueden clasificar en:
 - Polímeros naturales: Que a su vez se dividen en polisacáridos y proteínas fibrosas.
 - Polímeros sintéticos: Los cuales se dividen a su vez en poliolefinas, polímeros acrílicos y otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

Adsorción

En la adsorción, el compuesto, enzima o microorganismo, o un elemento mineral se unen a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno (Arroyo, 1998).

Como principales ventajas de este método destacan:

1. Su preparación sencilla.
2. Su bajo coste.
3. No hay cambios de especificidad enzimática.
4. Los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

Unión covalente

La unión covalente de un compuesto o enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos (Arroyo, 1998).

Reticulado

También denominado “**entrecruzamiento o cross-linking**”, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchos compuestos o enzimas.

El método del “reticulado” consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de un compuesto o enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear di-aldehídos, di-imino ésteres, di-isocianatos, sales de bis-diazonio e, incluso, di-aminas si están activadas con carbo di-imida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Arroyo, 1998).

El “**co-reticulado**”, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional (Arroyo, 1998).

La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50 Å), estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas (Arroyo, 1998).

4.- Procedimiento Experimental

INSTALACIONES

La experimentación del proyecto se llevará a cabo en diferentes instalaciones de la narro La parte analítica se realizará en los laboratorios del departamento de Botánica y en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Horticultura, mientras la parte de campo se llevará a cabo en el invernadero del área de Fisiología del departamento de Botánica. Algunas determinaciones analíticas se realizaran por parte de dos centros de investigación: CIQA y COLPUS.

Las metodologías a realizar se detallan a continuación:

INMOVILIZACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN UNA MATRIZ DE CALCIO-ALGINATO (Boadi y Neufeld, 2001)

Se dispersaron 0.0138gr de ácido salicílico en 1L de solución de alginato de sodio al 2% (P/V), resultando una concentración de 0.1mM de ácido salicílico. Las mezclas se dejaron gotear dentro de 50 mL de solución fría de CaCl₂ (0.06M), la cual se encontraba en continua agitación con ayuda de una mosca magnética. Las perlas resultantes tendrán un diámetro aproximado de 2.2mm. En el sobrenadante restante cuantificara la presencia del ácido salicílico para determinar la cantidad de fitohormona inmovilizada.

CARACTERIZACIÓN DE LA SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO

Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) (Bourbon et al., 2016)

Con la finalidad de confirmar la incorporación del compuesto bioactivo dentro de la matriz calcio-alginato se realizará un análisis de espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier en una región de longitud de onda entre 600 a 400 cm^{-1} usando 16 escaneos por cada muestra, para ello las muestras serán secadas y embebidas en pellets de KBr.

Cinética de liberación del compuesto bioactivo a partir de la matriz calcio-alginato

La liberación *in vitro* del compuesto bioactivo (ácido salicílico) fue realizado por el método de diálisis (Azevedo et al., 2014; Rivera et al., 2015). La matriz de calcio-alginato con el compuesto inmovilizado (5mL) fue puesto dentro de una membrana de diálisis, con un peso molecular de 8kDa) que subsecuentemente fue puesto dentro de 40mL de solución buffer with encapsulated (buffer de fosfatos a pH 7.0 y buffer de HCl-KCl a pH 2.0) usando un agitador magnético. A un intervalo apropiado de tiempo, se tomó 0.25mL de sobrenadante y se les añadió 0.25mL de buffer para mantener el volumen constante del medio liberado. La cantidad de ácido salicílico liberado a partir de la matriz calcio-alginato fue evaluado mediante la medición de este compuesto por HPLC según el método reportado por Forcatet *al.*, 2008. La prueba de liberación se realizó por triplicado,

APLICACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO INMOVILIZADO EN PLÁNTULAS DE TOMATE

Se utilizaron 10 macetas de 1 litro con una proporción de perlita y peatmoss (30:70) en las cuales se sembraron semillas de tomate variedad toro. Una vez que emerjan las plántulas serán colocadas en una mesa y se les aplicará fertirrigación utilizando una solución de Steiner al 25%, manteniendo la humedad del sustrato en un 80%. A los 10 días posteriores a la siembra se iniciará con la aplicación de los tratamientos. Se aplicarán las perlas con ácido salicílico inmovilizado en una matriz de calcio-alginato. A la par se utilizaron 10 macetas de 1 litro con una proporción de perlita y peatmoss (30:70) para llevar cabo el cultivo de plantas control negativo (sin aplicación de ácido salicílico inmovilizado) y 10 macetas de 1 litro con una proporción de perlita y peatmoss (30:70) para llevar cabo el cultivo de plantas control positivo (con ácido salicílico a 0.1mM sin inmovilizar).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO

Extracción (Aboulet *al.*, 2004; Segarraet *al.*, 2006)

Lastejidos de las plántulas de tomate se colocan en un mortero de mano y son congeladas con nitrógeno líquido, se maceran hasta obtener un polvo fino y en tubos eppendorf de 1.5 mL se pesan 50 mg de este polvo aún congelado. Al tubo eppendorff se le añade 1 mL de la solución de extracción y se procede a colocarlo en un vortex por aproximadamente 15 segundos, posteriormente se somete a ultrasonificación por 10 minutos para lograr una mejor solubilización del ácido salicílico. Al término de paso anterior el extracto es centrifugado a 13 000 rpm por 10 min y una vez finalizado este proceso el sobrenadante es extraído con una jeringa, filtrado a través de un filtro de VDF de 0.45 μm de poro y colocado en un eppendorff nuevo.

Cuantificación por HPLC (Forcatet *al.*, 2008)

El extracto obtenido en el paso anterior se desgasifica en un ultrasonificador por 5 min. En seguida 20 μL del extracto es inyectado en el cromatógrafo de líquidos. El análisis del ácido salicílico se lleva a cabo mediante el uso de una columna de C-18 (100 mm de longitud). Las fases móviles utilizadas son 50% de fase A (agua 94.9:acetonitrilo 5% :ácido fórmico 0.1%) y 50% de fase B (acetonitrilo 94.9%: agua 5%: ácido fórmico 0.1%) a un flujo de 0.6 mL/min, y controlando la temperatura de la columna a 35 °C. La detección de la molécula de ácido salicílico se realizará a una longitud de onda de 250nm. Para determinar la concentración del ácido salicílico en el extracto se realizará mediante una curva patrón hecha con estándar de ácido salicílico (0ppm a 500ppm) y siguiendo las mismas condiciones cromatográficas señaladas para los extractos.

POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL (Ahmad *et al.* 2008).

Extracción de Antioxidantes

Las hojas de las plántulas se liofilizarán por 24 hrs, posteriormente se macerarán con mortero de mano y se tomarán 100 mg de este tejido pulverizado más 10 mg de polivinilpirrolidona. Se colocarán en un tubo para centrifuga

y se le añadirán 1.5 mL de 0.1 M de buffer de fosfatos pH 7-7.2, y se sonificará por 5 min, posteriormente se llevará a cabo una microcentrifugación a 12500 rpm por 10 min a 4°C., el sobrenadante se recolectará y filtrará con una membrana de nylon (Ramos et al., 2010). Se diluirá en una proporción 1:15 con buffer de fosfatos.

Potencial Antioxidante Total

Se efectuará mediante la técnica del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), la forma oxidada de este radical absorbe a un máximo de 540 nm y la inhibición en la oxidación es atribuida directamente a la presencia de antioxidantes. La absorbancia se leerá en un lector de placas marca ELx800 mediante el uso de placas de 96 well. Se trazará una curva de TROLOX y los resultados serán expresados en unidades de mM de Equivalentes Trolox.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA (SOD, CAT, GPX)

SOD (Superóxido Dismutasa)

La superóxido dismutasa es considerada una de las más importantes de las enzimas debido su capacidad para reparar el daño de oxidación causado por ROS (radicales libres del oxígeno), por lo que es Por lo tanto, la SOD se cree que es una enzima clave para mantener las condiciones fisiológicas normales y hacer frente al estrés oxidante en la regulación de los niveles intracelulares de ROS (Gao et al., 2008; Mittler, 2002).

La actividad enzimática SOD se cuantificara a partir de un extracto de biomoléculas mediante una microplaca, utilizando el kit para determinación de SOD (SIGMA, 19160). El principio es la cuantificación espectrofotométrica de la reducción del colorante WST (water soluble tetrazoliumsalt) a WST- formazan por los iones superóxido formados mediante el conjunto xantina (XO)/xantina (X) oxidasa. La inhibición en la reducción del WST es atribuido a la neutralización de los radicales superóxido por la SOD, las unidades se expresan en % de inhibición.

CAT (Catalasa)

La enzima catalasa participa en la degradación del peróxido de hidrógeno formado agua y oxígeno, es la enzima antioxidante más efectiva en la prevención del daño oxidativo (Willekens et al., 1995, Mittler 2002).

La actividad de la catalasa se cuantificará mediante espectrofotometría. Se llevará a cabo midiendo 2 tiempos de reacción, tiempo 0 (T0) y tiempo 1 (T1). La mezcla de reacción para el blanco se preparará agregando 0.1 mL del extracto de biomoléculas, 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 y 0.4 mL de H₂SO₄ al 5%, y la mezcla de reacción para el T0 se preparará agregando 0.1 mL de extracto de biomoléculas, 1 mL de H₂O₂ 100 mM e inmediatamente después se añadirá 0.5 mL de H₂SO₄ al 5%, del mismo modo sucedió para el T1, salvo que la aplicación de los 0.5 mL del H₂SO₄ al 5% el cual se aplicará después de 1 minuto de reacción entre el extracto y el peróxido. La reacción se efectuará a una temperatura de 20 °C bajo agitación constante. Finalmente se leerá a 270 nm en el espectro de UV-Vis el consumo de H₂O₂. Las unidades de la actividad (UI) serán expresadas en mM H₂O₂ min⁻¹/ proteínas totales.

GPX (Glutación peroxidasa)

La Glutación peroxidasa es el nombre que reciben un conjunto de isoenzimas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o de hidroperóxidos orgánicos en agua o alcoholes correspondientes usando glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (Margis et al., 2008), eliminado de esta forma los radicales libres del oxígeno que causan estrés oxidativo en las plantas.

Se realizará mediante el método establecido por Xue et al., (2001) usando H₂O₂ como sustrato. Se colocarán 0.2 mL del extracto de biomoléculas en un tubo de ensaye más 0.4 mL de glutatión reducido 0.1 M y 0.2 mL de Na₂HPO₄ 0.067 M. Esta mezcla se precalentará en baño de agua a 25 °C por 5 minutos, posteriormente se le agregarán 0.2 mL de H₂O₂ 1.3 mM para iniciar la reacción catalítica. Se dejará reaccionar por 10 min. y se detendrá mediante la adición de 1 mL de ácido tricloro acético al 1%. Esta mezcla de reacción será puesta en baño de hielo por 30 min. Enseguida la mezcla se centrifugará a 3000 RPM por 10 min. Se tomarán 0.48 mL del sobrenadante y se colocarán en un tubo de ensaye, se le agregará 2.2 mL de Na₂HPO₄ 0.32 M y 0.32 mL de una solución 1 mM del colorante ácido 5,5 ditio-bis-2-nitro benzoico (DTNB). Se leerá en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm. Las unidades de la actividad (UI) se expresarán expresadas en mM glutatión min⁻¹/ proteínas totales.

DETERMINACIÓN DE BIOMASA (Velasco et al., 2016)

Para determinar la biomasa (materia seca; MS) se realizaran muestreos destructivos a los 50 días posteriores a la siembra. El material vegetal incluirá hojas, tallos, flores y frutos de cinco plantas representativas por tratamiento. El

secado de la planta se realiza en estufa a temperatura constante de 70°C durante 72h y posteriormente se pesara la MS con balanza electrónica.

VARIABLES DE CRECIMIENTO (Ávila *et al.*, 2015).

- **Peso Seco**

Las plántulas serán divididas en tallo, raíz y hojas y se pesarán utilizando una balanza digital marca OHAUS®, registrando el peso fresco. Posteriormente se colocarán en un horno de secado por 24 horas a una temperatura de 60°C para luego pesarse y registrar nuevamente el peso seco expresado en gramos.

- **Número de hojas**

El número de hojas se cuantificará contando cada lámina foliar dentro de la hoja compuesta.

- **Diámetro del tallo**

El diámetro del tallo fue tomará mediante el uso de un vernier digital a 10 cm sobre la base del tallo.

- **Altura de la planta.**

La altura se medirá con cinta métrica flexible desde la base del tallo.

- **Crecimiento de la raíz**

La longitud de la raíz será medida con una regla milimétrica.

PRODUCTIVIDAD DEL CULTIVO DE TOMATE (Velasco *et al.*, 2016)

Para obtener el rendimiento total se pesaron los frutos cosechados 90ddt (después del trasplante), comparando el rendimiento de las plantas con tratamiento (ácido salicílico inmovilizado) contra el rendimiento de las plantas control negativo (plantas sin ácido salicílico) y plantas control positivo (plantas con ácido salicílico sin inmovilizar).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos serán analizados con el programa Statistical Analysis Systems (SAS, 2002) versión 9.0, donde se realizó el análisis de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0,05$).

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Inmovilizar y caracterizar el tipo de inmovilización de un compuesto bioactivo (ácido salicílico) en una matriz calcio-alginato.	X	X	X									
Aplicación del compuesto bioactivo encapsulado (ácido salicílico) en el sustrato usado para el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate.				X	X	X						
Evaluar la concentración del ácido salicílico en plántulas de tomate.							X	X				
Determinar el potencial antioxidante total, la biomasa y variables de crecimiento en las plántulas de tomate con aplicación del compuesto bioactivo encapsulado.							X	X	X	X	X	
Reporte de resultados 2018												X

Cronograma de Actividades para el 2019.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Aplicación del compuesto bioactivo encapsulado (ácido salicílico) en el sustrato usado para el crecimiento y desarrollo de plantas adultas de tomate.	X	X	X	X								
Evaluar la productividad del cultivo de tomate.				X								
Determinar la biomasa y variables de crecimiento en las plantas adultas de tomate con aplicación del				X	X							

compuesto bioactivo encapsulado.													
Determinar el potencial antioxidante total y la actividad antioxidante enzimática (SOD, CAT, GPX).						X	X	X	X				
Evaluar la concentración del ácido salicílico en plantas adultas de tomate.										X	X		
Reporte de resultados 2019													X

Cronograma de Actividades para el 2020.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Determinar si hay resistencia a patógenos en plantas de tomate sometidas a un tratamiento con aplicación de ácido salicílico encapsulado.	X	X	X	X								
Evaluar la productividad del cultivo de tomate.				X								
Determinar la biomasa y variables de crecimiento en las plantas de tomate sometidas a estrés biótico con aplicación del compuesto bioactivo encapsulado.				X	X							
Cuantificar el potencial antioxidante total y actividad antioxidantes enzimáticos (CAT, SOD, GPX) en plantas de tomate sometidas a estrés biótico						X	X	X	X			
Evaluar la concentración del ácido salicílico en las raíces, hojas, tallos y frutos de las plantas de tomate sometidas a estrés biótico.										X	X	
Reporte de resultados 2020												X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Inmovilizar y caracterizar el tipo de inmovilización de un compuesto bioactivo (ácido salicílico) en una matriz calcio-alginato.	X	X										
Aplicación del compuesto bioactivo encapsulado (ácido salicílico) en el sustrato usado para el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate.			X	X								
Evaluar la concentración del ácido salicílico en plántulas de tomate.						X	X					
Determinar el potencial antioxidante total, la biomasa y variables de crecimiento en las plántulas de tomate con aplicación del compuesto bioactivo encapsulado.							X	X	X			

Duración total del proyecto

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

5.-Productos Esperados

- Presentación del trabajo en 2 Congresos relacionados con el área de Investigación.
- Publicar 2 artículos en revista indexada.
- Obtención de tesis una Licenciatura.
- Obtención de tesis una Especialidad o Maestría.

6.-Literatura Citada

1. Aboul S.M.A.M., Cook K., Loake G.J. 2004. Measurement of Salicylic Acid by a High Performance Liquid Chromatography Procedure Based on Ion-Exchange. *Chromatographia*. 59 (1-2): 129-133.
2. Ali H.E.M.; Ismail G.S.M. 2014. Tomato fruit quality as influenced by salinity and nitric oxide. *Turkish Journal of*

3. Arroyo, 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars. Pharmaceutica*. 39:2; 23-39.
4. Ávila J.L., Rodríguez G.A., Rodríguez P.N., Guevara G.R.G., Torres P. I., Ocampo V.R.V., Moustapha B. 2015. Vermicompost leachate as a supplement to increase tomatofruit quality. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 15(1):46-59.
5. Benavides M.A., Salazar T.A., RamírezG.F., RobledoT.V., RamírezR.H.,Maiti., R. 2004. Tratamiento desemilla de chile con ácidos salicílico y sulfosalicílico y respuesta de las plántulas al frío. *Terra Latinoamericana*. 22: 41-47.
6. Biswal D.R., Singh R.P. 2004. The flocculation and rheological characteristics of hydrolyzed and unhydrolyzed grafted sodium alginate in aqueous solutions. *J. Appl. Polym. Sci.*94: 1480-1488.
7. Blandino A., Macias M., Cantero D. 1999. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. *J. Biosci. Bioeng.*88: 686-689.
8. Boadi D.K., Neufeld R.J. 2001. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 590-595.
9. Bourbon A.I., Cerqueira M.A., Vicente A.A. 2016. Encapsulation and controlled release of bioactive compounds in lactoferrin-glycomacropeptidnanohydrogels: Curcumin and caffeine as model compounds. *Journal of Food Engineering*.180: 110-119.
10. Burgain, J., Gaiani C., Linder M., Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104: 467-483.
11. Burey, P., Bhandari B.R., Howes T., Gidley M.J. 2008. Hydrocolloid gel particles, formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48: 361-377.
12. Casierra P.F., Aguilar A.O.E. 2008. Calidad en frutos de tomate (*Solanumlycopersicum* L.) cosechados en diferentes estados de madurez. *Agronomía Colombiana*. 26(2): 300-307.
13. Chen M.J., Chen K.N. 2007. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA, pp. 83-107.
14. Douglas K.L., Tabrizian M. 2005. Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation for their potential application as DNA carrier. *J. Biomat. Sci-Polym. E*.16: 43-56.
15. Draget K.I. 2000. Alginates. In: *Handbook of Hydrocolloids*. pp. 379-395. Phillips, G. O., and Williams, P. A., Eds., CRC Press, Boca Raton. 948p.
16. Draget K.I., Skjak B.G., Smidsrod O. 1994. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. *CarbohydrPolym*.25: 31-38.
17. Forcat S., Bennett M.H., Mansfield J.W., Grant M.R. 2008. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods*. 4:16. doi:10.1186/1746-4811-4-16.
18. Gao S., Ouyang C., Wang S., Xu Y., Tang L., Chen. F. 2008. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. *Plant Soil Environ*. 54(9): 374-381.
19. Gemes K., Poor P., Sulyok Z., Szepesi A., Szabo M., Tari I. 2008. Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rio Fuego) under salt stress. *Acta Biologica Szegediensis*. 52(1): 161-162.
20. Girling R., Madison R., Hassall M., Poppy G., Turner, J. 2008. Investigation into plant biochemical wound-responses pathways involved in the production of aphid-induced plant volatiles. *Journal of Experimental Botany*. 59 (11): 3077-3085.
21. Gombotz W.R., WU S.F. 1998. Protein release from alginate. *Advanced Drug Delivery Reviews*.31: 267-285.
22. Goh C.H., Heng P.W.S., Chan L.W. 2012. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. 88: 1-12.
23. Janjarasskul T., Krochta J. 2010. Edible packaging materials. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1: 415-448.
24. Kader, A.A. 1992. Postharvest biology and technology: an overview. pp. 15-20. En: Kader, A.A. (ed.). *Postharvest technology of horticultural crops*. Publication 3311. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, California.
25. Khan N., Syeed S., Masood N., Nazar R., Iqbal N. 2010. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidant metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *International Journal of Plant Biology*. 1 (1), DOI:10.4081/pb.2010.e1
26. King, A.H. 1983. Brown Seaweed Extracts (Alginates). In: *Food Hydrocolloids*. pp.115-182
27. Liu X.D., Bao D.C., Xue W.M., Xiong Y., Yu W.T., Yu X.J., Ma X.J., Yuan Q. 2003. Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. *J. App. Polym. Sci.*87: 848-852.
28. Margis R., Dunand C., Teixeira F.K., Margis P.M. 2008. Glutathione peroxidase family- an evolutionary overview. *FEBS Journal*. 275: 3959-3970.

29. Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
30. Mustafa, N., Kin, H., Choi, Y. and Vepoorte, R. 2009. Metabolic changes insalicylic acid-elicited *Catharanthusroseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolic. *Biotechnol. Lett.* 31: 1967-1974.
31. Purcarea C., Cachita C.D. 2010. Studies regarding the effects of salicylic acid in maize (*Zea mays* L.) seedling under salt stress. *Studia Universitat, Seria tiin ele Vie ii.*, 20 (1): 63-68.
32. Rowe, R.C. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th edition. London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association. 1064p.
33. Segarra G., Jauregui O., Casanova E., Trillas I. 2006. Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumissativus* under biotic stress. *Phytochemistry.* 67: 395-401.
34. Smrdel P., Bogataj M., Zega A., Planinsek O., Mrhar A. 2008. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation.* 25(2): 90-105.
35. Szepesi, A. 2006. Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* Mill. L. to high salinity by approximating its salt stress response to that of the wild species *L. pennellii*. *Acta Biologica Szegediensis.* 50 (3-4): 177.
36. Velasco A.M.J., Castro B.R., Castillo G.A.M., Avitia G.E., Sahagún C.J., Lobato O.R. 2016. Composición mineral, biomasa y rendimiento en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) injertado. *INTERCIENCIA.* 41(10): 703-708.
37. Wang, L., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Lui, J., Cheng, J., Luo, H. and Li, S. 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *Plant Biology.* 10:34.
38. Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., Van Camp W. 1995. Catalases in plants. *Mol. Breed.* 1: 207-228.
39. Yeo, Y., Baek N., Park K. 2001. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 6(4): .213-230.
40. Zhang Z., Li Q., Li Z., Staswick P., Wang M., Zhu Y., He Z. 2009. Dual regulation role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiology.* 145: 450-464.
41. Zheng X., Zhou M., Yooa H., Pruneda P.J.L., Weaver S.N., Kay S.A., Dong X. 2015. Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *PNAS.* 112(30): 9166-9173. doi: 10.1073/pnas.1511182112