



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Ingeniería Agroindustrial

**Manejo de la relación azufre:selenio en solución nutritiva para incrementar el potencial nutracéutico de forraje verde hidropónico.**

Opción de titulación  
**Tesis Individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Ingeniero Agroindustrial

**Presenta:**

Karla Mariana Reséndiz Contreras

Dirigido por:

M.C Juan Antonio Valencia Hernández

M.C Juan Antonio Valencia Hernández  
Presidente

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Secretario

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez  
Vocal

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Vocal

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de la Facultad de Ingeniería

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2019

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de alfalfa (*Medicago sativa*) cultivada como forraje verde hidropónico con diferentes concentraciones de Se (en forma de selenato  $\text{SeO}_4^{6+}$ ) y solución nutritiva. El experimento se llevó a cabo en dos diferentes fases: *in vitro* en caja petri e *in vivo* bajo invernadero. Los tratamientos fueron los mismos para ambas fases y fueron los siguientes: 0, 0.25, 0.5 y 0.75 ppm de Se en combinación con diferentes niveles de solución nutritiva: 50, 75 y 100 %. Se analizaron fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante DPPH y ABTS. Adicionalmente se determinó la concentración de Se y P total. Fue posible demostrar que la aplicación de Se incrementa la bioacumulación de este elemento 2 y 4.8 veces con tratamientos de 0.5 y 0.75 ppm respectivamente, resultando ser una buena opción para la producción de forraje o germinado enriquecido con selenio. Los resultados en calidad antioxidante, señalan que a menor nivel de solución nutritiva (50 %) el efecto de la suplementación con Se es más visible, destacando el tratamiento con 0.75 ppm de Se en los análisis de flavonoides y actividad antioxidante ABTS. Sin embargo, el tratamiento con 0 ppm obtuvo los mejores resultados en fenoles totales y actividad antioxidante DPPH. Para las siguientes investigaciones, se recomienda incrementar la dosis de Se para observar mejor calidad antioxidante, así como profundizar en el estudio de Se como factor para reducir el empleo de fertilizantes.



## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the antioxidant properties of alfalfa (*Medicago sativa*) cultivated as a green hydroponic forage with different concentrations of Se (selenate  $\text{SeO}_4^{6+}$  mineral form) and nutrient solution. The experiment was carried out in two different phases: petri dish and greenhouse. The following treatments were the same in both phases: 0, 0.25, 0.5 and 0.75 ppm Se in combination with different levels of nutrient solution: 50, 75 and 100 %. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity (DPPH and ABTS) were evaluated. Additionally, the concentration of total Se and P was determined. It was possible to demonstrate that the application of Se increases the bioaccumulation of this element 2 and 4.8 times with treatments of 0.5 and 0.75 ppm respectively, constituting an effective method for the production of selenium-biofortified forage and sprouts. The antioxidant activity results show that the lower of nutrient solution level (50 %), the more visible are the effects of selenium-supplementation, highlighting the 0.75 ppm Se treatment, specifically in flavonoids and ABTS analysis. However, the treatment of 0 ppm obtained the better results in total phenolic compounds and DPPH analysis. Therefore, a more investigations need to be realized in order to determine more antioxidant properties increasing the selenium-dose, as well as study if Se could be a factor to reduce the fertilizer usage.

## DEDICATORIAS

A mis padres, que no sólo son pilares de mi vida, si no que me han enseñado a construir los míos. Los admiro enormemente por todo lo que han sobrellevado, los sacrificios que se han hecho y todo el empeño que ponen día tras día. Su apoyo siempre va más allá, los quiero con todo el corazón.

A Isaac por tanto cariño que genera en mí, agradezco cada circunstancia que me hizo llegar a ti.

*Dios es mi causa primera y mi fin último.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por las grandes enseñanzas que me llevo y a todo el apoyo recibido.

A mi director de tesis y sinodales por guiar mis primeros pasos en el mundo de la investigación.

A diferentes personas que colaboraron directa o indirectamente en este trabajo: Silvia Pineda por su gran ayuda en el laboratorio, Natalia Barreto por apoyarme con el diseño de la presentación, a mis papás Ma. Guadalupe Contreras y J. Trinidad Reséndiz por grandes aportaciones en la experimentación, a Isaac Vega que me ha acompañado desde el principio hasta el fin de este proceso.

A todo el personal del Campus Amazcala quienes en diferentes ocasiones fueron un gran refuerzo a lo largo de todo el tiempo que estudié ahí.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	2
SUMMARY .....	3
DEDICATORIAS .....	4
AGRADECIMIENTOS .....	5
ÍNDICE GENERAL .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABLAS .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES .....	16
2.1 Importancia mundial del Se .....	16
2.1.1 Propiedades y aplicaciones .....	16
2.2 Distribución del Se en el mundo. ....	17
2.3 Importancia nutricional del Se en humanos. ....	19
2.4 Importancia del Se en la ganadería .....	21
2.5 Fuentes de Se en las plantas. ....	22
2.6 Fuentes de Se en los alimentos .....	23
2.7 Metabolismo del Se en plantas. ....	23
2.8 Metabolismo del Se en animales. ....	24
2.9 Descripción tecnológica .....	25
2.9.1 Legislaciones .....	27
3. HIPÓTESIS .....	28
4. OBJETIVOS .....	28
4.1 Objetivo general .....	28

4.2	Objetivos específicos .....	28
5.	METODOLOGÍA.....	29
5.1	Diseño experimental. ....	29
5.2	Localización del área de estudio.....	29
5.3	Materiales y condiciones de cultivo.....	30
5.4	Método de producción (fase laboratorio) .....	34
5.4.1	Materiales: .....	34
5.4.2.	Procedimiento: .....	35
5.5	Método de producción (fase invernadero).....	41
5.5.1	Materiales: .....	41
5.5.2	Procedimiento: .....	42
5.6	Análisis en laboratorio .....	50
5.6.1	Extracción de compuestos fenólicos .....	50
5.7	Análisis estadístico .....	52
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
6.1	Prueba de germinación .....	53
6.2	Fenoles totales .....	53
6.3	Flavonoides totales .....	58
6.4	Capacidad antioxidante DPPH .....	62
6.4.1	Porcentaje de inhibición DPPH .....	66
6.5	Capacidad antioxidante ABTS.....	69
6.5.1	Porcentaje de inhibición ABTS.....	73
6.6	Selenio y Fósforo total.....	76
7.	CONCLUSIONES.....	79
8.	ANEXOS .....	80

8.1	Curva de calibración para la determinación de fenoles totales .....	80
	.....	80
8.2	Curva de calibración para la determinación de flavonoides .....	81
8.3	Curvas de calibración para la determinación de actividad antioxidante (DPPH) .....	82
8.4	Curvas de calibración para la determinación de actividad antioxidante (ABTS) .....	83
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	84

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación geográfica mundial de la distribución estimada de Se en el suelo antes del año 2000 (Jones et al., 2017)	18
<b>Figura 2.</b> Representación geográfica de la reducción de la concentración de Se debido al cambio climático proyectada para el futuro (2080-2090) (Jones et al., 2017).	18
<b>Figura 3.</b> Vista satelital del campus Amazcala (Google 2019).	30
<b>Figura 4.</b> Planta de alfalfa ilustrada por Wilhelm en 1985	30
<b>Figura 5.</b> Soluciones nutritivas stock con 100 ppm Se	33
<b>Figura 6.</b> Saco con 10 g semillas hecho con manta de cielo	35
<b>Figura 7.</b> Sacos de semilla después de la imbibición	36
<b>Figura 8.</b> Semillas al término del proceso de imbibición	36
<b>Figura 9.</b> Lote experimental después del primer riego	37
<b>Figura 10.</b> Gráfico de la distribución del riego en cada caja petri durante los 6 días de crecimiento del cultivo	38
<b>Figura 11.</b> Evolución del cultivo en cajas petri. Días 1,2,3 y 4	39
<b>Figura 12.</b> (a) Cultivo en el día 5. (b) Último día de cultivo	39
<b>Figura 13.</b> Cajas petri antes de ser almacenadas	40
<b>Figura 14.</b> Preparación para el almacenamiento en congelación	40
<b>Figura 15.</b> Pesaje de semillas	42
<b>Figura 16.</b> Elaboración de los sacos	42
<b>Figura 17.</b> Saco de semilla	42
<b>Figura 18.</b> Desinfección de charolas	43
<b>Figura 19.</b> Enjuague de material con agua destilada	43
<b>Figura 20.</b> Sacos de semilla en remojo	44
<b>Figura 21.</b> Lote experimental de charolas de FVH	44
<b>Figura 22.</b> Semillas distribuidas sobre la charola	45
<b>Figura 23.</b> Diferentes tratamientos en los rociadores	45
<b>Figura 24.</b> Distribución del riego en la fase de invernadero	46
<b>Figura 25.</b> Charolas antes de recibir el primer riego con solución nutritiva	47

<b>Figura 26.</b> Cultivo al segundo día de riego _____	47
<b>Figura 27.</b> Cultivo al cuarto día de riego _____	48
<b>Figura 28.</b> Cultivo en el último día de riego _____	48
<b>Figura 29.</b> Charola de forraje en el día de cosecha _____	49
<b>Figura 30.</b> Toma de muestra de las charolas _____	49
<b>Figura 31.</b> Fenoles totales en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	56
<b>Figura 32.</b> Fenoles totales en nutrición al 75% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	56
<b>Figura 33.</b> Fenoles totales en nutrición al 100% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	57
<b>Figura 34.</b> Flavonoides totales en nutrición al 50% en ambas fases del experimento. ( $P \leq 0.05$ ) _____	60
<b>Figura 35.</b> Flavonoides totales en nutrición al 75% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ) _____	60
<b>Figura 36.</b> Flavonoides totales en nutrición al 100% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ) _____	61
<b>Figura 37.</b> Capacidad antioxidante DPPH en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	64
<b>Figura 38.</b> Capacidad antioxidante DPPH en nutrición al 75 % en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	64
<b>Figura 39.</b> Capacidad antioxidante DPPH en nutrición al 100% en ambas fases del experimento Tuckey ( $P \leq 0.05$ ). _____	65
<b>Figura 40.</b> Porcentaje de inhibición del radical DPPH al 50% de nutrición en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	67
<b>Figura 41.</b> Porcentaje de inhibición del radical DPPH al 75% de nutrición en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	67
<b>Figura 42.</b> Porcentaje de inhibición del radical DPPH al 75% de nutrición en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	68
<b>Figura 43.</b> Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	71

<b>Figura 44.</b> Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 75% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	71
<b>Figura 45.</b> Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 100% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	72
<b>Figura 46.</b> Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	74
<b>Figura 47.</b> Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	74
<b>Figura 48.</b> Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ). _____	75
<b>Figura 49.</b> Concentración total de Se expresada en ppm de peso seco de muestras de alfalfa. Los tratamientos corresponden a la solución nutritiva al 50% ( $P \leq 0.05$ ). _____	77
<b>Figura 50.</b> Concentración total de P expresada en ppm de peso seco de muestras de alfalfa. Los tratamientos corresponden a la solución nutritiva al 50 % ( $P \leq 0.05$ ). _____	78
<b>Figura 51.</b> Curva estándar para la cuantificación de fenoles totales _____	80
<b>Figura 52.</b> Curva estándar para la cuantificación de flavonoides totales _____	81
<b>Figura 53.</b> Curva estándar para la cuantificación de actividad antioxidante DPPH _____	82
<b>Figura 54.</b> Curva del porcentaje de inhibición del radical DPPH _____	82
<b>Figura 55.</b> Curva estándar para cuantificación de actividad antioxidante ABTS _	83
<b>Figura 56.</b> Curva estándar para cuantificación de actividad antioxidante ABTS _	83

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Propiedades fisicoquímicas generales del Se (Modificación de Newland, 1982, IUPAC, 2019, Winkel et al., 2015)</i> _____	16
<b>Tabla 2.</b> <i>Efectos de la deficiencia y beneficios de la suplementación de Se en ganado. (adaptada de Brummer et al. 2014)</i> _____	21
<b>Tabla 3.</b> <i>Tratamientos empleados en ambas fases del experimento</i> _____	29
<b>Tabla 4.</b> <i>Solución nutritiva modificada por Álvarez (2009) a partir del Manual Técnico de Forraje Verde Hidropónico emitido por la FAO (2001)</i> _____	31
<b>Tabla 5.</b> <i>Marca y pureza de los fertilizantes empleados</i> _____	32
<b>Tabla 6.</b> <i>Aportación general de los nutrientes para la solución nutritiva al 100%</i> _____	32
<b>Tabla 7.</b> <i>Aportación general de Se en los diferentes tratamientos. Ajuste por pureza incluido</i> _____	33
<b>Tabla 8.</b> <i>Riego empleado durante el ciclo de cultivo</i> _____	38
<b>Tabla 9.</b> <i>Manejo del riego en el cultivo</i> _____	46
<b>Tabla 10.</b> <i>Prueba de germinación</i> _____	53
<b>Tabla 11.</b> <i>Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa (<math>P \leq 0.05</math>). Los valores sombreados indican el valor máximo con diferencia significativa.</i> _____	55
<b>Tabla 12.</b> <i>Cuantificación de flavonoides presentes en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa (<math>P \leq 0.05</math>). Los valores sombreados señalan el valor máximo con diferencia significativa de cada fase.</i> _____	59
<b>Tabla 13.</b> <i>Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase (<math>P \leq 0.05</math>)</i> _____	63
<b>Tabla 14.</b> <i>Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase (<math>P \leq 0.05</math>).</i> _____	66

**Tabla 15.** Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase ( $P \leq 0.05$ ). \_\_\_\_\_ 70

**Tabla 16.** Determinación del porcentaje de inhibición del radical ABTS en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase ( $P \leq 0.05$ ). \_\_\_\_\_ 73

**Tabla 17.** Concentración total de Se y P en muestras de alfalfa en peso seco. Los tratamientos corresponden a la solución nutritiva al 50%. Los tratamientos con diferente letra simbolizan diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tuckey ( $P \leq 0.05$ ). \_\_\_\_\_ **¡Error! Marcador no definido.**

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de los micronutrientes y su rol en la salud humana y animal han sido demostrados en múltiples estudios. Son varias las enfermedades causadas por deficiencia de micronutrientes en la dieta y afectan a la población de países subdesarrollados y desarrollados, debido a que gran parte de la absorción de los elementos traza depende de su existencia en el suelo donde se desarrollan los cultivos (Coppinger RJ y Diamond, 2001).

El selenio (Se) es un elemento traza que cumple un papel esencial en la salud de los mamíferos (Rayman, 2000). Fue descubierto en 1817 por Jöns Jacob Berzelius y fue considerado como elemento tóxico, hasta que Schwartz y Foltz (1957) descubrieron su importancia en la nutrición. En un contexto general, el Se es un complejo, pero interesante elemento, ya que sus propiedades hacen que la frontera entre toxicidad y deficiencia sea muy estrecha en animales (Frankenberger, 1994).

Las plantas no requieren de Se para sobrevivir, sin embargo, lo pueden absorber del suelo debido a sus propiedades químicas, similares al azufre (S), como consecuencia, el Se puede ser incorporado al metabolismo a través de la ruta de asimilación del S. (Sors *et al.*, 2005). De esta forma, el Se entra en la cadena alimentaria a través de las plantas (Li *et al.*, 2014).

Generalmente, las dietas que contienen de 0.1- 0.5 mg Se/kg resultan ser adecuadas para el buen desarrollo de los animales dependiendo de la especie. Sin embargo, varios suelos no son capaces de proveer esa cantidad a las plantas (Lin y Shiau, 2007). Los animales que crecen con bajas dosis de Se en su dieta suelen tener un pobre crecimiento y estar predispuestos a diversas patologías, incluso la muerte (Frankenberger, 1994).



En humanos, se ha demostrado que el Se juega un papel muy importante actuando como antioxidante en el sistema endócrino e inmune, por lo que diversas investigaciones se siguen realizando debido a sus propiedades anticancerígenas (Dharmasena, 2014). Debido a que el ser humano obtiene el 70% de Se de alimentos que provienen de origen animal como la carne, el huevo y la leche, es importante garantizar el buen suministro de Se a los animales a través de su alimentación (Alfthan *et al.*, 2015),

Hay diversas prácticas que han sido comúnmente empleadas para contrarrestar la deficiencia de Se en ganado, tales como; inyecciones, suplementos, piedras de sales y en diluciones. Estos mecanismos han tenido un grado razonable de éxito, sin embargo, son costosos, consumen mucho tiempo y existe el riesgo de sobredosis debido al manejo del Se. Estas dificultades probablemente causen que muchas unidades de producción se rehúsen a proporcionar Se al ganado (Ropstad *et al.*, 1988)

Es por eso que en el presente trabajo de investigación se propone enriquecer forraje verde hidropónico a base de alfalfa como alternativa para proveer a los animales del Se requerido y que puedan beneficiarse de sus propiedades, así como obtener de ellos alimentos que proporcionen una dosis adecuada para la nutrición humana.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### 2.1 Importancia mundial del Se

#### 2.1.1 Propiedades y aplicaciones

El selenio tiene propiedades fisicoquímicas que son intermedias entre metales y no metales y pertenece al grupo VI A de la tabla periódica (Frankenberger, 1994). Diferentes propiedades se enlistan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas generales del Se (Modificación de Newland, 1982, IUPAC, 2019, Winkel et al., 2015)

Propiedad	Valor
Número atómico	34
Masa atómica	78.971 g/mol
Densidad	4.79 g/cm <sup>3</sup>
Punto de fusión	217 ° C
Punto de ebullición	685.4 ° C
Radio Atómico	0.117 μm
Estados de oxidación	(-II), (-I), (0), (IV) y (VI)
Estructura cristalina	Hexagonal

Es Se es mayormente usado en la industria del vidrio para contrarrestar la coloración del óxido de hierro y para proporcionar color rojo. Su empleo como colorante también se extiende en plástico y pinturas. En la industria del caucho es utilizado por ser resistente al calor, a la luz y a varios químicos. De igual manera, sus cualidades antioxidantes lo hacen útil para elaboración de tintas, lubricantes, resinas, pegamentos y aceites (Newland, 1982). Hay un sinnúmero de aplicaciones en dispositivos electrónicos por sus propiedades fotoeléctricas y semiconductoras (Fishbein, 1983).

## 2.2 Distribución del Se en el mundo.

El Se, metaloide considerado finito y no renovable, es ampliamente distribuido en pequeñas cantidades en el ambiente (agua, suelo y aire) en dosis menores a 1mg/kg (Bem, 1981).

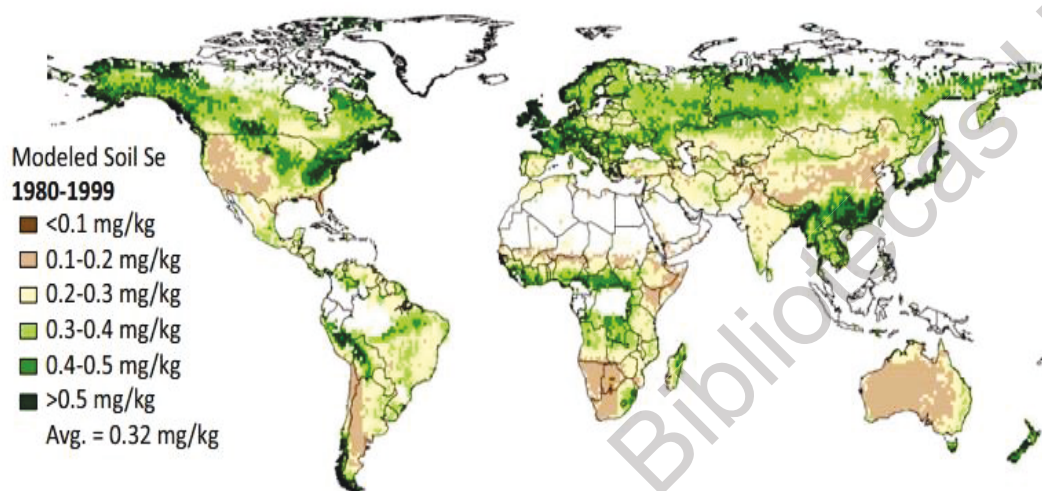
### 2.2.1 Se en el suelo

Los suelos son la mayor fuente de Se para las plantas. Es encontrado principalmente en forma de selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) y en selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ). También puede estar presente como Se elemental, seleniuro ( $\text{Se}^{2-}$ ) y en compuestos orgánicos. (Brummer *et al.*, 2014).

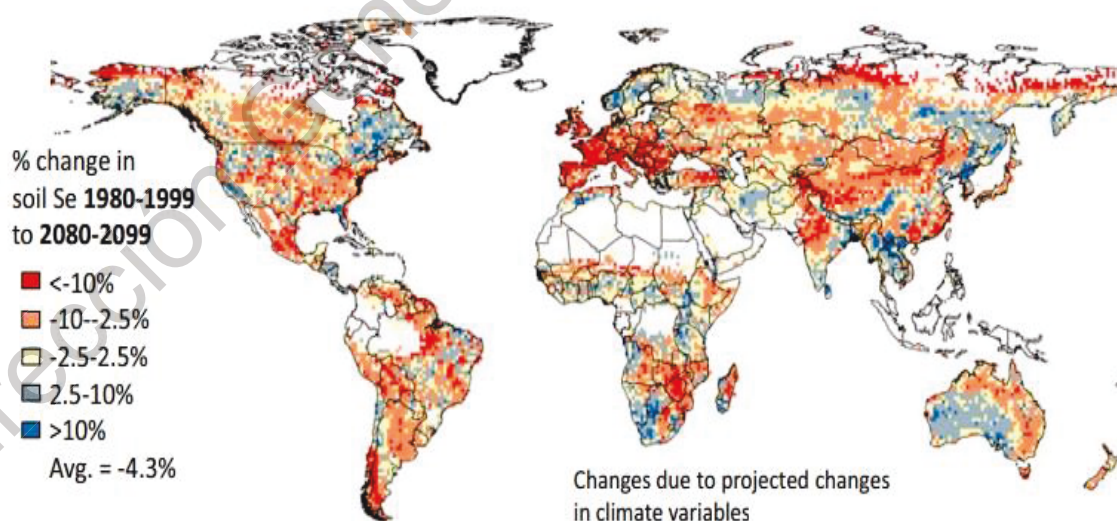
Se puede agrupar a los suelos en no seleníferos y seleníferos. Los no seleníferos registran niveles  $< 1$  mg Se/ kg, mientras que los seleníferos, van de 2 mg Se/ kg en adelante (Mikkelsen *et al.*, 1989). Algunos ejemplos de regiones que tienen contenidos altos en Se son aquellas que contienen lutita negra, una roca sedimentaria con alto contenido en carbón y diferentes metales (Plant *et al.*, 2014). Irlanda posee suelos con alto nivel de Se, alcanzando niveles hasta 1250 mg/kg que resultan en toxicidad para los cultivos (Oldfield, 2002). Algunas regiones de China y zonas áridas de Estados Unidos poseen suelos seleníferos también (Presser *et al.*, 1994). La deficiencia de Se en el suelo es reportada en varias partes del mundo donde los principales países afectados son China, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia, Finlandia (Oldfield, 2002).

En México existe también una notable deficiencia de Se en el suelo, principalmente en el altiplano (Ramírez *et al.*, 2004) siendo Chihuahua y Coahuila los únicos estados que poseen una cantidad adecuada de Se para los cultivos (Tórtola *et al.*, 2012)

Un modelo de proyección llevado a cabo por Jones *et al.*, 2017, estima que los suelos de todo el mundo sufrirán importantes pérdidas de Se debido al cambio climático que afecta las interacciones geoquímicas de este elemento en el suelo, por lo que existirá el riesgo de deficiencia en los cultivos.



**Figura 1.** Representación geográfica mundial de la distribución estimada de Se en el suelo antes del año 2000 (Jones *et al.*, 2017)



**Figura 2.** Representación geográfica de la reducción de la concentración de Se debido al cambio climático proyectada para el futuro (2080-2090) (Jones *et al.*, 2017).

## 2.3 Importancia nutricional del Se en humanos.

Desde 1817 cuando el Se fue descubierto por Berzelius, un químico suizo, no se le atribuía importancia significativa, ni se le relacionaba con los seres vivos, es más, era más conocido por sus propiedades tóxicas, hasta que (Schwartz y Foltz, 1957) descubren que este elemento, en asociación con la vitamina E y los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) mantiene un papel esencial en la nutrición animal y hace posible la prevención de la degeneración necrótica del hígado. Desde entonces, el Se ha despertado un inquietante interés debido a sus múltiples cualidades preventivas y nutricionales.

Numerosos estudios han continuado desde ese entonces atribuyendo al Se propiedades benéficas ya que forma parte elemental en la enzima glutatión peroxidasa, que protege a las células de daños por peróxido de hidrógeno (Rotruck, 1973). El mismo año, el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que “el Se es un oligoelemento esencial que no puede ser reemplazado por otros nutrientes”. También se ha demostrado que este elemento tiene un potencial quimiopreventivo del cáncer, al ser capaz de destruir peróxidos no filtrados por la vitamina E (Haferman, 1974). Fishben en 1986 da una detallada información de cómo la deficiencia en Se en la nutrición humana está vinculada con ciertas patologías como: desnutrición, anemia hemolítica, cardiomiopatía (enfermedad de Keshan), hipertensión, enfermedad isquémica del corazón, fibrosis quística, infertilidad, cáncer, artritis, distrofia muscular y esclerosis múltiple. Estas condiciones fisiológicas desfavorables pueden ser tratadas con dieta rica en Se ya sea de forma orgánica o inorgánica. De esta manera, se llega a asumir que el Se es un elemento esencial para los animales (dentro de ellos, el ser humano), ya que las enzimas en las que participa son encargadas de regular el metabolismo por medio de la tiroides y de prevenir la degradación celular (EP Patente nº 1602716A1, 2005).

Adicionalmente, es necesario para el buen funcionamiento del sistema inmune y el sistema reproductivo, disminuye el riesgo de mortalidad embrionaria temprana en la mujer, así como también disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Rayman, 2000).

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## 2.4 Importancia del Se en la ganadería

La deficiencia en Se, ha sido diagnosticada en muchas especies incluyendo ganado vacuno, bovino, caprino, equino, porcino y así como también ciervos y alces (Brummer, Pirelli, & Hall, 2014).

En 1958 se descubrió la enfermedad del músculo blanco, padecimiento que se caracteriza por debilidad muscular, anomalía cardíaca, dificultad para crecer y ganar peso (Brummer, Pirelli, & Hall, 2014).

Brummer *et al.*, (2014) elaboraron una tabla donde se enuncian los efectos por la deficiencia de Se de acuerdo a la especie y así como los beneficios que se obtienen la suplementación del Se (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efectos de la deficiencia y beneficios de la suplementación de Se en ganado. (adaptada de Brummer *et al.*, 2014)

GANADO	DEFICIENCIA DE SE	BENEFICIOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SE
Vacuno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Becerras con pocas defensas</li> <li>• Anomalías en el sistema inmune</li> <li>• Dificultad para crecer (madurar)</li> <li>• Infecciones uterinas</li> <li>• Mastitis</li> <li>• Placenta retenida</li> <li>• Reducción de fertilidad en vacas y en toros</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de mastitis en rebaños lecheros</li> <li>• Control de placenta retenida</li> <li>• Ganancia de peso en becerros</li> <li>• Mejora en el sistema inmunológico</li> <li>• Incremento de la fertilidad</li> </ul>
Ovino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificultad para ganar peso</li> <li>• Disminución de parto gemelar</li> <li>• Baja eficacia del sistema inmune</li> <li>• Susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento de la fertilidad</li> <li>• Ganancia de peso</li> <li>• Inmunidad contra la pododermatitis</li> <li>• Mejora en la actividad de respuesta de los anticuerpos</li> <li>• Alto desempeño reproductivo</li> <li>• Incremento de anticuerpos en calostro</li> </ul>
Caprino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Casi similar a los ovinos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción del nivel de mastitis</li> </ul>
Caballos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja función inmunológica</li> <li>• Miopatía; dificultades en la locomoción, para tragar, respirar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Información no disponible aún</li> </ul>

La mayoría de experimentos publicados de animales suplementados con Se, son basados usando formas de Se inorgánicas como el selenito y selenato de sodio mientras que la forma química predominante en el forraje es la selenometionina (Hall *et al.*, 2017).

## 2.5 Fuentes de Se en las plantas.

Las concentraciones del Se en las plantas dependen de la cantidad que exista en los suelos donde se desarrollan. La incorporación del Se por las raíces, ocurre de manera rápida dependiendo la especie y las condiciones fisiológicas de la planta. En la mayoría de los casos, el 85% de  $\text{SeO}_4^{2-}$  y el 70% de  $\text{SeO}_3^{2-}$  son encontrados en tejidos aéreos de la planta. (Coughtrey *et al.*, 1983).

El selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) es absorbido por las plantas diez veces más que el selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) (Coughtrey *et al.*, 1983). Estos dos compuestos son metabolizados en los cloroplastos por las mismas rutas metabólicas para el azufre ya que hay muchas similitudes entre estos dos elementos (Terry y Zayed, 1994).

Es importante mencionar que el pH del suelo influye en la absorción de Se por las plantas; en suelos ácidos la asimilación es menor que en suelos alcalinos (Brummer, Pirelli, & Hall, 2014). También el contenido de materia orgánica, la actividad microbiana, irrigación y compactación son factores que controlan la fitoaccesibilidad del Se (Rayman, 2008).

El contenido normal en forrajes oscila entre 0.1 y 0.5 ppm, concentraciones mayores a 5 ppm comienzan a ser peligrosas si son ingeridas por el ganado. (Neve *et al.*, 1998). Reportes de toxicidad crónica en ganado fueron encontradas a dosis tan bajas como  $0.4 \text{ mg Se kg}^{-1}$  de peso corporal por día en ganado vacuno, mientras que en ganado ovino  $0.08 \text{ mg Se kg}^{-1}$  (Maclowiak y Amacher, 2008)

Hay otras como *Machaeranthera* y *Oonoposis* que poseen 800 ppm. Los pastos contienen más Se que las leguminosas, de acuerdo con Minson (1990), sin embargo, varía si el suelo es pobre en Se. Los cereales pueden almacenar Se en sus semillas, principalmente en forma de selenometionina (Underwood *et al.*, 2004).

## 2.6 Fuentes de Se en los alimentos.

La forma en la que el Se se encuentra en los alimentos es en compuestos orgánicos en los que destacan la selenometionina, la selenocisteína y selenocistina (Martínez, 1992).

La cantidad de selenio en los alimentos, depende de la ubicación y condiciones donde las plantas y animales se desarrollan (Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique, 2008).

Cereales granos, carne, pescados y mariscos, así como las nueces y los huevos, son las fuentes principales de Se. Por otra parte, las frutas, legumbres, leche y sus derivados son deficientes de este elemento. (Varo *et al.*, 1988).

En las carnes, su contenido varía entre 0.10 y 0.30  $\mu\text{g/g}$ , mientras que la carne de animales suministrados de Se (Smith *et al.*, 1982), la concentración incrementa hasta 1  $\mu\text{g/g}$  (Smith *et al.*, 1982), mientras que Rayman (2008) señala que la carne y pescados y mariscos son los mayores aportadores de Se en la alimentación, llegando a contener de 0.4-1.5  $\mu\text{g/g}$ .

Los pescados y mariscos a pesar de ser ricos en Se, éste presenta una disponibilidad biológica limitada del 20 al 50%, debido a las uniones al mercurio y otros metales pesados. Sin embargo, la biodisponibilidad es alta en cereales, cerveza y la mayor parte de los productos vegetales (de 85-100%) (Smith *et al.*, 1982).

## 2.7 Metabolismo del Se en plantas.

El rol del Se en las plantas permanece ambiguo aún y que su distribución dentro de las plantas ha sido muy poco estudiada (Bai. 2018). Hay varios estudios donde se evalúa el comportamiento del Se, principalmente en plantas hiperacumuladoras y cereales. Sin embargo, la esencialidad del Se en las plantas es controversial actualmente (El-Raady *et al.*, 2016).

Las especies de plantas no acumuladoras concentran hasta 25 mg Se kg<sup>-1</sup> de peso seco (Mikkelsen *et al.*, 1989). Las plantas de absorción secundaria crecen normalmente en áreas con concentraciones de Se en el suelo de bajas a medias y pueden acumular de 25 a 100 mg Se kg<sup>-1</sup> de peso seco. Algunos ejemplos son los géneros *Aster*, *Atriplex*, *Castelleja*, *Grindelia*, *Gutierrezia*, *Machaeranthera* y *Mentzelia*. Las plantas selenoacumuladoras pueden concentrar hasta 20,000 ppm tales como *A. bisulcatus*, *A. racemosus*, *A. pectinatus*, *A. thephorosides*, *A. praelongus* (Minson, 1990)

A pesar del panorama anterior, existen estudios donde se reporta que cuando el Se es añadido en determinadas concentraciones, pueden existir efectos benéficos relacionados con el crecimiento (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2015); (Jiang *et al.*, 2015, Nawaz *et al.*, 2013) y la productividad dentro de ambientes de estrés y no estrés (Guerrero *et al.*, 2014, Kaur y Nayyar 2015).

## 2.8 Metabolismo del Se en animales.

Para que el cuerpo pueda integrar el Se en los aminoácidos no convencionales (selenometionina, selenocisteína y selenocistina) debe pasar por un proceso de reducción, donde los selenatos o selenitos se convierten a selenuros y de esta manera pueden ser incorporados y formar dichos aminoácidos (Discroll y Copeland, 2003)

Estos selenoaminoácidos son absorbidos de forma eficaz a nivel duodenal y en el íleon anterior (King *et al.* 1981). Este argumento, sugiere que los animales no poseen mecanismo regulador de la absorción; el selenito no es distinguido del sulfito por los sistemas biológicos y puede haber una competencia en absorción por parte del selenato y del sulfato (Seijias *et al.*, 1992).

Así que se puede asumir que, metabólicamente hablando, el radical S puede ser sustituido por el radical Se al sintetizar los selenoaminoácidos. La selenometionina es considerada la forma más óptima de suplementación de Se para

animales y humanos ya que está presente de forma habitual en los alimentos y se logra almacenar eficientemente en las proteínas corporales (Bautista *et al.*, 2010).

El Se que fue absorbido es captado de una manera muy rápida por el hígado y los eritrocitos y retorna al plasma como forma metabolizada (Schwartz *et al.*, 1972).

La absorción de la selenometionina por parte de los animales monogástricos es mayor que la del selenito, en una relación 80%, frente al 50% (Cupp *et al.*, 1990).

La suplementación de Se requiere de especial cuidado, ya que se requiere en pequeñas cantidades y un ligero aumento en la dosis puede resultar tóxico. En seres humanos tanto como en animales el requerimiento es de 0.3 g por tonelada de alimento (Hefnawy y Tórtora, 2010). La Food and Nutrition Board (1980) recomienda que las concentraciones de Se en los tejidos de las plantas forrajeras no sobrepasen los 5mg kg<sup>-1</sup> y de 60 a 75 µg por día para seres humanos.

Los países que tienen bajas dosis en consumo de Se por habitante son: Francia (36 µg por día), Reino Unido (34 µg por día) y Suiza (35 µg por día) por debajo de la recomendación mínima de 40 µg por día (Rayman, 2008).

## 2.9 Descripción tecnológica

La incorporación del Se como una nueva forma de añadir características nutraceuticas a las plantas ha tenido ya algunos avances que se mencionan a continuación:

Se ha reportado el desarrollo de un fertilizante asperjado de selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) combinado con zinc y hierro, (CN Patente nº 101225006A, 2008) en cultivo de arroz.

Así mismo se ha publicado un fertilizante para fresa enriquecido con Se con el fin de incrementar su capacidad nutracéutica (CN Patente nº 1017811144B, 2013).

Nuevamente en China, se desarrolló un fertilizante (CN Patente nº 102795938A, 2012) a base de Se para compensar la deficiencia nutrimental de su población mediante aplicaciones foliares en cultivos como el maíz, arroz y plantas de té. La dosis de Se correspondiente a esta invención fue de 0.058g/L que equivale a 58 ppm de este elemento, obtenido de selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ).

También hay una patente que hace mención a la implementación de un fertilizante de al menos uno de los siguientes micronutrientes: cromo, cobalto, hierro, cobalto, manganeso, cobre y zinc en combinación opcional con boro, cloro, yodo, molibdeno y Se. (US Patente nº 20100240533A1, 2009).

Se ha reportado un fertilizante capaz de incrementar la cantidad de Se de 10-300 veces dependiendo el cultivo (trigo, maíz, sorgo, arroz, cebada, girasol, cacahuate, papa, caña de azúcar, manzana, pera, durazno, uva, albaricoque) donde la aplicación de éste, puede ser asperjada o inyectada. (CN Patente nº 1088725A, 1993). La misma patente describe que en el mercado chino ya se presentan una gran variedad de productos enriquecidos con Se como la sal, la cerveza y algunas bebidas fortificadas, sin embargo, se presenta la necesidad de emplear aditivos compuestos de Se que dificultan poder realizar una mezcla uniforme, es caro y muy fácil de producir intoxicación.

En la ganadería el suministro de Se en los animales se realiza añadiendo selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) en la pastura (CN Patente nº 1088725A, 1993), pero la cantidad no es fácil de manipular debido a la alta probabilidad de causar envenenamiento en el ganado, aunado a la poca absorción del Se inorgánico por parte de los animales (Cupp *et al.*, 1990).

Una ingeniosa forma de suministrar Se al ganado mediante el forraje fue la que describe la patente (US Patente nº 6058649A, 2000) en la que una capa protectora, cubre a la semilla con las cantidades de Se fijas para la planta (maíz,



soya, cebada), evitando de esta manera, un riesgo para el agricultor al manipular este elemento, pues representa una alta probabilidad de absorción mediante la piel o por inhalación.

Para que el ganado rumiante pueda recibir las cantidades de Se adecuadas, se desarrolló en Estados Unidos una formulación a base de Se y azufre donde el Se elemental se disuelve en azufre elemental fundido para después enfriar, formando una solución sólida ideal para ser distribuida en suelos con carencia selénica (US Patente nº 4847087A, 1986).

### **2.9.1 Legislaciones**

En 1987 la FDA (Food and Drugs Administration) empezó a incorporar al Se en sus regulaciones como aditivo debido a su gran toxicidad (Hall *et al.*, 2017). En el título 21, se especifica la dosis de suplementación de 0.3 mg Se/kg (ppm) en alimento para ganado bovino, ovino, porcino, así como en pollos, pavos y patos. En bovinos no se debe de exceder la dosis de 3 mg Se/cabeza/día mientras que en ovinos 0.7 mg Se/cabeza/día (FDA, 2016).

### 3. HIPÓTESIS

La calidad nutracéutica de las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) se incrementará al proporcionar Se en la solución nutritiva del cultivo.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial nutracéutico como actividad antioxidante y contenido de Se total

#### 4.2 Objetivos específicos

- Producir forraje verde hidropónico mediante el suministro nutricional con diferentes relaciones de azufre:Se.
- Determinar los niveles de absorción de Se en el forraje verde hidropónico producido.
- Evaluar la capacidad antioxidante de forraje verde hidropónico a base de alfalfa con diferentes niveles de Se.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Diseño experimental.

El experimento fue llevado a cabo en dos fases distintas: la primera a nivel laboratorio y la segunda se escaló en un invernadero adaptado para forraje verde hidropónico. Los tratamientos fueron diseñados para regular el nivel de azufre partiendo de una solución nutritiva especial para forraje verde hidropónico (FAO, 2001) y el contenido de Se. Por cada tratamiento se realizaron tres repeticiones dentro de un diseño completamente al azar.

*Tabla 3. Tratamientos empleados en ambas fases del experimento*

% de Solución nutritiva para FVH FAO (2001)	A 0 ppm Se (control)	B 0.25 ppm Se	C 0.5 ppm Se	D 0.75 ppm Se
50%	A1	B1	C1	D1
75%	A2	B2	C2	D2
100%	A3	B3	C3	D3

### 5.2 Localización del área de estudio.

El experimento fue desarrollado en el campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro. La comunidad de Amazcala, pertenece al municipio de El Marqués, Querétaro. Se localiza en el sector suroeste del estado, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud norte. Su longitud se encuentra entre los 100° 09' y los 100° 24' del Oeste alrededor de 1850 m sobre el nivel del mar (Balam, 2007).



**Figura 3.** Vista satelital del campus Amazcala (Google Earth, 2018).

### **5.3 Materiales y condiciones de cultivo.**

#### **5.3.1 Material vegetal**

Como legumbre perene la alfalfa (*Medicago sativa*) es uno de los cultivos más utilizados como alimento para ganado lechero y de carne (Jensen *et al.*, 2012), pues sintetiza una mayor cantidad de proteína respecto a otros forrajes (Meyer *et al.*, 1956). Ver figura 4.



**Figura 4.** Planta de alfalfa ilustrada por Wilhelm en 1985

Debido a las cualidades anteriormente descritas, en el presente trabajo se utilizó semilla de alfalfa variedad San Miguelito adquirida en “Semillas Correa” en presentación de 20 kg.

### 5.3.2 Prueba de germinación

Se pusieron a germinar 25 semillas por triplicado colocadas en una caja de petri sobre papel absorbente previamente saturado con agua tridestilada. Las semillas fueron conservadas en condiciones de oscuridad con el fin de mantener a humedad hasta su germinación.

### 5.3.3 Preparación de solución nutritiva

Se empleó una fórmula modificada por Álvarez (2009) a partir de la solución propuesta por la FAO (2001). Ver tabla 4.

**Tabla 4.** Solución nutritiva modificada por Álvarez (2009) a partir del Manual Técnico de Forraje Verde Hidropónico emitido por la FAO (2001)

FERTILIZANTE	FÓRMULA QUÍMICA	CANTIDAD (g) / 200 L	ppm
Fosfato Monoamónico	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	32	160
Nitrato de Calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	300
Nitrato de Potasio	$\text{KNO}_3$	60	300
Nitrato de Magnesio	$\text{MgNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64	320
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	68	340
Ácido Bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.2	6
Quelato de Hierro	$\text{C}_{10}, \text{H}_{12}, \text{O}_8, \text{N}_2, \text{FeNa} * 3\text{H}_2\text{O}$	16	80
Quelato de Manganeso	$\text{C}_{10}, \text{H}_{12}, \text{O}_8, \text{MnNa}_2$	3	15
Quelato de Zinc	$\text{C}_{10}, \text{H}_{12}, \text{O}_8, \text{N}_2, \text{ZnNa}_2$	0.8	4
Quelato de Cobre	$\text{C}_{10}, \text{H}_{12}, \text{O}_8, \text{N}_2, \text{CuNa}_2$	1	5
pH: 5.8			CE: 1.97
		<b>15 ml de ácido nítrico</b>	

Los fertilizantes fueron adquiridos en el almacén del campus Amazcala. La marca y la pureza se describen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Marca y pureza de los fertilizantes empleados

FERTILIZANTE	MARCA	% PUREZA
Fosfato Monoamónico	Greenhow®	98
Nitrato de Calcio	Greenhow®	98
Nitrato de Potasio	Greenhow®	99
Nitrato de Magnesio	Greenhow®	99
Sulfato de Magnesio	Greenhow®	98.70
Ácido Bórico	--	17.5
Quelato de Hierro	Greenhow®	13
Quelato de Manganeseo	Greenhow®	13
Quelato de Zinc	Greenhow®	15
Quelato de Cobre	Greenhow®	15
Ácido Nítrico	--	55

La preparación de solución nutritiva para la fase 1 (laboratorio) se realizó sobre un volumen de 2 L y para fase 2 (invernadero) en 20L. Fueron tomadas todas las precauciones necesarias para evitar la interferencia de sales durante formulación. En la tabla 6 se desglosa la información de cada ión.

**Tabla 6.** Aportación general de los nutrientes para la solución nutritiva al 100%

IÓN	PESO MOLECULAR (g/mol)	ppm (mg/L)	mmol/L	meq/L
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	62	489.230	7.891	7.891
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	18	25.040	1.391	1.391
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	96	130.950	1.364	0.682
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	97	134.950	1.391	1.391
K	39	114.680	2.941	2.941
Ca <sup>+2</sup>	40	49.820	1.246	0.623
Mg <sup>+2</sup>	24.3	62.430	2.569	1.285
Fe <sup>+2</sup>	55.8	10.400	0.186	0.093
BO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	10.5	0.990	0.094	0.031
Cu <sup>+2</sup>	63.5	0.750	0.012	0.006
Zn <sup>+2</sup>	65.4	0.600	0.009	0.005
Mn <sup>+2</sup>	55	1.95	0.035	0.018

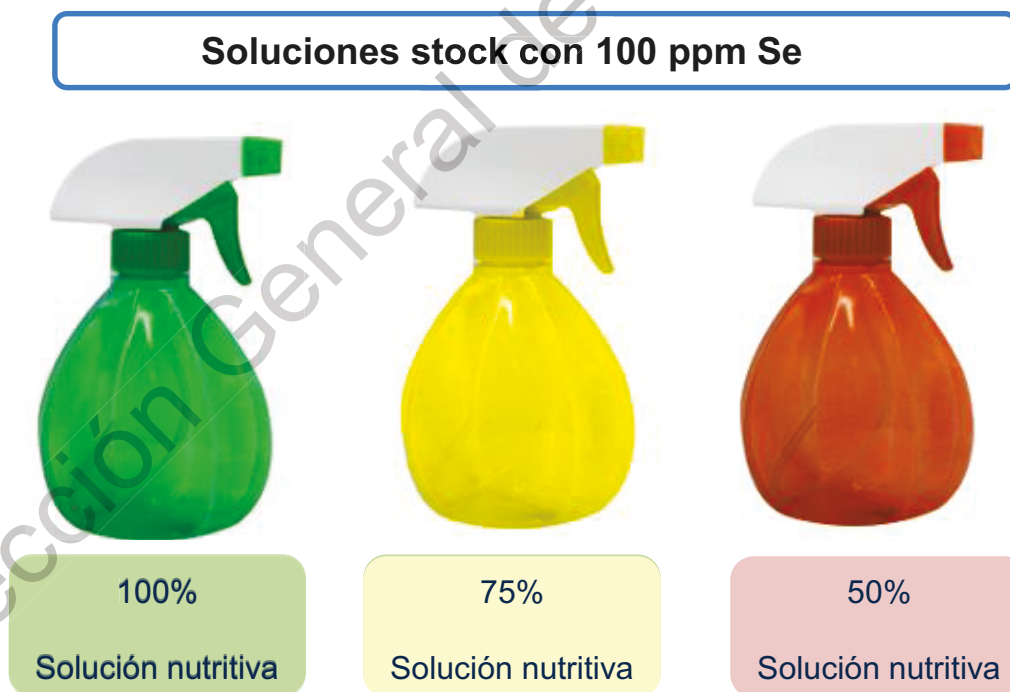
### 5.3.4 Preparación de los tratamientos con Se

Se empleó selenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ), reactivo de la marca Sigma Aldrich con una pureza del 95% a tres diferentes dosis. Las dosis de selenio fueron adicionadas a los diferentes niveles de solución nutritiva (50, 75 y 100 %).

*Tabla 7. Aportación general de Se en los diferentes tratamientos. Ajuste por pureza incluido*

FORMA DE ABSORCIÓN (ION)	PESO MOLECULAR (g/mol)	Se ppm (mg/L)	$\text{SeO}_4^{2-}$ ppm (mg/L)	mM $\text{SeO}_4^{2-}$	$\mu\text{M}$ $\text{SeO}_4^{2-}$	meq/L $\text{SeO}_4^{2-}$
$\text{SeO}_4^{2-}$	142.97	0.25	0.4525	0.0031	3.1657	0.0063
		0.5	0.9051	0.0063	6.3151	0.01266
		0.75	1.3577	0.0094	9.4970	0.01899

Para lograr una mayor facilidad en el manejo del Se, se realizaron tres soluciones stock con 100 ppm de Se con los diferentes niveles de solución nutritiva.



*Figura 5. Soluciones nutritivas stock con 100 ppm Se*



### 5.3.5 Condiciones generales del cultivo hidropónico

- **Dosis de siembra:** Se colocaron 1.8 kg/m<sup>2</sup> de semilla en ambas fases.
- **Capa de semillas pre-germinadas:** 0.7 – 1.2 cm de altura

### 5.4 Método de producción (fase laboratorio)

#### 5.4.1 Materiales:

- 360 g de semilla de alfalfa
- 36 cajas petri de plástico (diámetro de 8.5 cm)
- 12 frascos de 100 ml con atomizador
- 36 sacos hechos de manta de cielo (15x15 cm)
- 36 elásticos
- 10 L de agua tridestilada

## 5.4.2. Procedimiento:

### 5.4.2.1 Preparación de la semilla

Las semillas fueron pesadas y colocadas 10 g de ellas en pequeños trozos de manta de cielo de 15X15 cm. Los pequeños sacos fueron atados con bandas de plástico chicas (Figura 6)



*Figura 6. Saco con 10 g semillas hecho con manta de cielo*

### 5.4.2.2 Desinfección de la semilla

Se desinfectó la semilla durante 2 minutos en una solución de 1% de hipoclorito de sodio. Posteriormente se realizó un enjuague con agua tridestilada.

### 5.4.2.3 Remojo o imbibición de la semilla

Se inició el proceso de imbibición dejando a las semillas 12 horas en remojo. Después fueron puestas a orear durante una hora para después continuar con un último remojo de 12 horas.

#### 5.4.2.4 Siembra en cajas de petri

Una vez que los sacos de semillas salieron de la fase de imbibición (Figura 7), fueron retiradas las bandas elásticas que los ataban y la manta de cielo fue extendida sobre la caja petri (Figura 8). Se procuró mantener la buena distribución de las semillas sobre las cajas petri. El diámetro de las cajas petri fue de 8.5 cm



*Figura 7. Sacos de semilla después de la imbibición*



*Figura 8. Semillas al término del proceso de imbibición*

#### 5.4.2.5 Riego

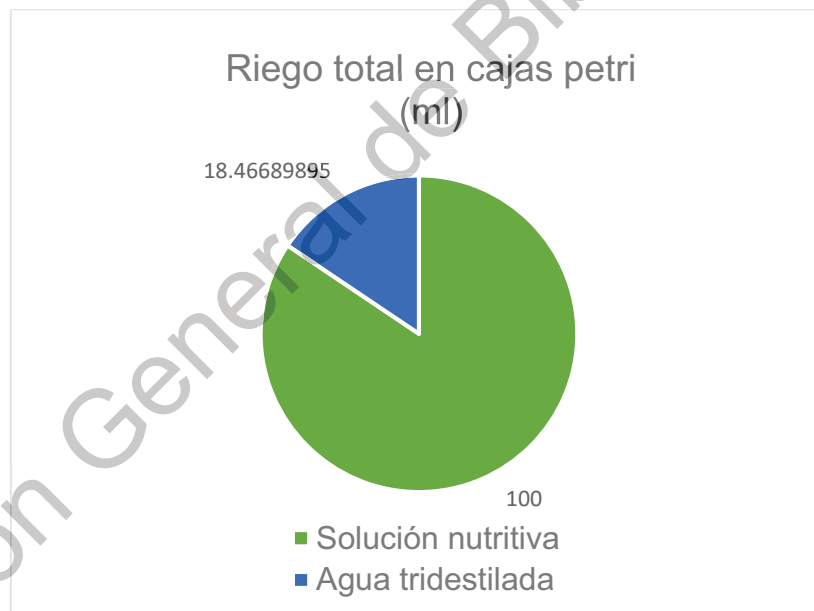
El riego se llevó a cabo pasadas 15 horas después de la siembra, pues aún se conservaba la humedad (Figura 9). Los diferentes tratamientos con solución nutritiva, fueron colocados en frascos atomizadores de 100 ml. Detalles del riego se mencionan en la tabla 8. La relación entre la cantidad de agua destilada y solución nutritiva, se describe en la figura 10. La evolución del cultivo se representa en las figuras 11 y 12.



**Figura 9.** Lote experimental después del primer riego

**Tabla 8.** Riego empleado durante el ciclo de cultivo

DÍA	NÚMERO DE ATOMIZACIONES POR CAJA PETRI	ml	DESCRIPCIÓN
1	--	--	Inicio del proceso de imbibición (etapa de remojo)
2	12	4.1811	Riego con agua tridestilada
3	85	29.6167	Riego con solución nutritiva
4	120	41.8118	Riego con solución nutritiva
5	70 + 33	24.3902 + 11.4982	Riego con solución nutritiva + agua tridestilada
6	20	6.9686	Enjuague con agua tridestilada.



**Figura 10.** Gráfico de la distribución del riego en cada caja petri durante los 6 días de crecimiento del cultivo





**Figura 11.** Evolución del cultivo en cajas petri. Días 1,2,3 y 4



(a)



(b)

**Figura 12.** (a) Cultivo en el día 5. (b) Último día de cultivo

#### 5.4.2.6 Cosecha

La cosecha se llevó a cabo el día 6 después de un enjuague con agua tridestilada (Figura 13). Para su posterior análisis, cada una de las muestras fue colocada en papel aluminio y almacenada en congelación (-20 ° C) (Figura 14).



**Figura 13.** Cajas petri antes de ser almacenadas



**Figura 14.** Preparación para el almacenamiento en congelación

## 5.5 Método de producción (fase invernadero)

### 5.5.1 Materiales:

- 8.5 kg de semilla de alfalfa
- 36 charolas para FVH
- 12 rociadores de 3.7 L marca HDX®
- 15 m de tela tipo organza
- 36 elásticos
- Agua destilada
- Termómetro para interior y exterior marca STEREN®

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## 5.5.2 Procedimiento:

### 5.5.2.1 Preparación de la semilla

Se utilizó la misma dosis de siembra que en la fase anterior. Fueron pesados 234 g de semillas (Figura 15), para después ser colocadas en sacos hechos de tela tipo organza de 40x40 cm (Figura 16). El saco de semilla se representa en la figura 17.



**Figura 15.** Pesaje de semillas



**Figura 16.** Elaboración de los sacos



**Figura 17.** Saco de semilla

### 5.5.2.2 Desinfección del material y semilla

Se emplearon sales cuaternarias de amonio para la desinfección de las tinas, charolas y estantes en una concentración de 200 ppm (Figura 18). Se procedió a hacer un enjuague con agua destilada para evitar cualquier interferencia de sales (Figura 19)

La semilla se desinfectó durante 2 minutos en una solución de 1% (v/v) de hipoclorito de sodio. Posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada.



**Figura 18.** Desinfección de charolas



**Figura 19.** Enjuague de material con agua destilada

### 5.5.2.3 Remojo o imbibición de la semilla

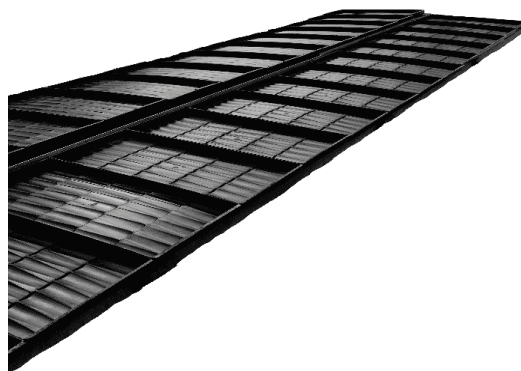
Las semillas fueron colocadas en dos tinas de 100 L de volumen (18 sacos de semillas en cada una) para después añadir 4 L de agua destilada en cada tina (Figura 20). Pasadas 12 horas se renovó el agua, pero esta vez empleando 8 L debido a la expansión de las semillas.



*Figura 20. Sacos de semilla en remojo*

### 5.5.2.4 Siembra en charolas para FVH

Una vez que las charolas se secaron (Figura 21) y que el proceso de imbibición concluyó, se cubrió a las charolas con tela tipo organza para después colocar a las semillas (Figura 22).



*Figura 21. Lote experimental de charolas de FVH*



*Figura 22. Semillas distribuidas sobre la charola*

#### 5.5.2.5 Riego

El riego se realizó manual por medio de rociadores (Figura 23). Esto permitió mayor control al evitar salpicaduras y dispersión de las soluciones nutritivas en las otras charolas.

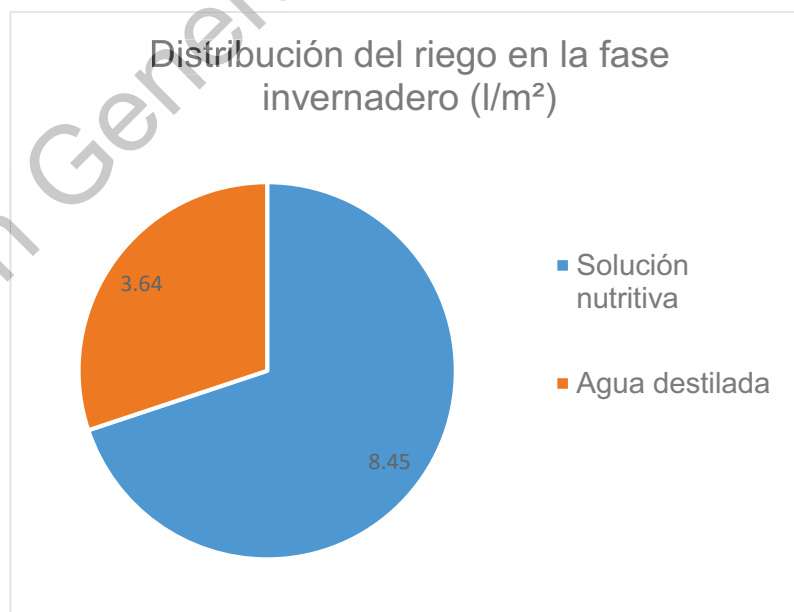


*Figura 23. Diferentes tratamientos en los rociadores*

Por variables como radiación solar, humedad y temperatura, fue necesario emplear más agua en el cultivo de lo estipulado. El agua suministrada en el riego fue cuantificada gracias a que los rociadores estaban graduados. Los detalles del riego se mencionan en la tabla 9 y la relación de riego con agua destilada y solución nutritiva se representa en la figura 24. La evolución del cultivo se ilustra en las figuras 24, 26, 27 y 28.

**Tabla 9.** Manejo del riego en el cultivo

DÍA	RIEGO (l/m <sup>2</sup> )	OBSERVACIONES
1	---	Proceso de imbibición en agua destilada
2	1.88	Agua destilada
3	2.72	Tratamientos con solución nutritiva
4	2.72	Tratamientos con solución nutritiva
5	2.72	Tratamientos con solución nutritiva
6	1.13 + 1.76	Tratamientos con solución nutritiva + Enjuague con agua destilada



**Figura 24.** Distribución del riego en la fase de invernadero

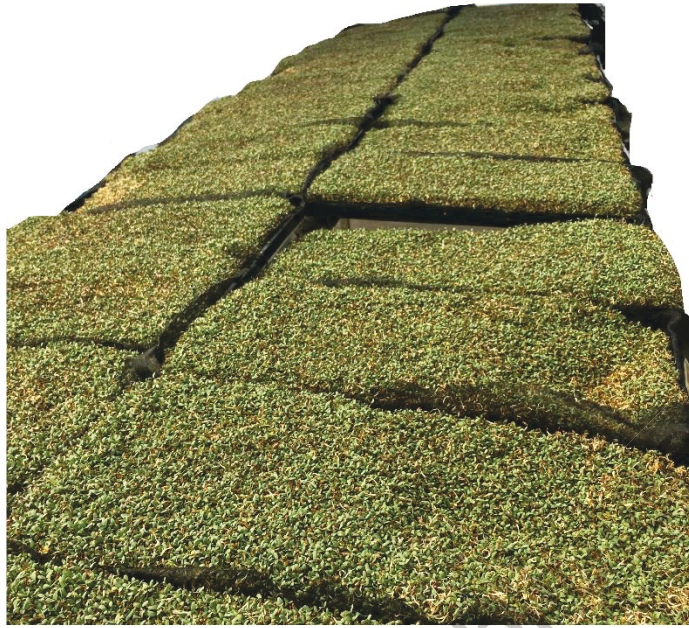




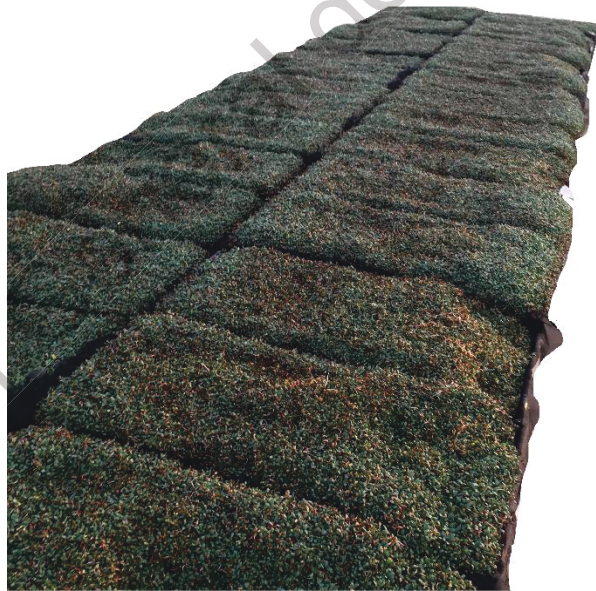
**Figura 25.** Charolas antes de recibir el primer riego con solución nutritiva



**Figura 26.** Cultivo al segundo día de riego



*Figura 27. Cultivo al cuarto día de riego*



*Figura 28. Cultivo en el último día de riego*



### 5.5.2.6 Cosecha

La cosecha se llevó a cabo el día 6 después de un enjuague con agua destilada (Figura 29 y 30) Para su posterior análisis, cada una de las muestras fue colocada en papel aluminio y almacenada en congelación (-20 ° C).



*Figura 29. Charola de forraje en el día de cosecha*



*Figura 30. Toma de muestra de las charolas*



## 5.6 Análisis en laboratorio

### 5.6.1 Extracción de compuestos fenólicos

#### 5.6.1.1 Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al, 1999). El cual se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, en pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 760 nm. Este reactivo está formado por ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico.

Para la determinación de fenoles totales se tomaron 40 mL de extracto metanólico y se le adicionaron 460  $\mu\text{L}$  de agua destilada más 250 $\mu\text{L}$  de Folín más 1250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Posteriormente se sometió a agitación de 1 min en Vortex para después dejar en reposo por 2 horas en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan GO). La cuantificación se realizó interpolando los resultados de una curva estándar de ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg Eq AG/ g de alfalfa).

#### 5.6.1.2 Flavonoides

La cuantificación se realizó mediante el método de (Oomah, 2005). Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico y acuoso de la muestra a los cuales se le adicionaron 180  $\mu\text{L}$  de metanol más 20  $\mu\text{L}$  de 2-aminoeetildifenilborato al 1 %. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan GO) a una longitud de onda de 404 nm. Los resultados fueron interpretados con la curva estándar y los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina/ g de alfalfa.

## 5.6.2 Determinación de actividad antioxidante

### 5.6.2.1 DPPH

El fundamento del método desarrollado por (Williams, 1995), consiste en utilizar un radical libre 2,2-difenil-1picrilhidrazilo (DPPH), que es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Se siguió el método modificado por Fukumoto y Mazza (2000) para uso en microplaca. Se preparó 200  $\mu\text{L}$  de reactivo DPPH con 20  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico y se leyó a una absorbancia de 520 nm cada 10 minutos durante 90 minutos con un espectrofotómetro (Thermo Multiskan GO), la placa se mantuvo cubierta y en oscuridad entre cada lectura.

### 5.6.2.2 ABTS

Para este análisis se utilizó el método descrito por Nenadis et al., (2004) modificado para su uso en microplaca. El radical ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) se obtiene tras la reacción de ABTS con persulfato potásico. Para generar el radical, el vial se mantuvo en oscuridad durante 12 horas y a temperatura ambiente. Se monitoreó su absorbancia con un espectrofotómetro (Thermo Multiskan GO) a una longitud de onda de 764 nm en un rango de 0.7 y 1.0 de absorbancia. La lectura de las muestras fue llevada a cabo con 230  $\mu\text{L}$  de etanol más 20  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico de la muestra y los resultados fueron leídos a una absorbancia de 520 nm. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{M}$  de Trolox / g de alfalfa.

### 5.6.2.3 Porcentaje de inhibición

En las pruebas de DPPH y ABTS, se expresó la actividad antioxidante como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad del radical neutralizado por el extracto de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} * 100$$

### 5.6.3 Determinación de Se total (ICP-AES)

En esta parte del análisis se escogió un control y dos muestras que tuvieron un comportamiento relevante en los análisis anteriores. El análisis se realizó por parte del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) mediante un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo con base en peso seco (2 gr aprox).

Añadida a la determinación de Se total, se agregó la cuantificación de fósforo (P) total, que es un indicador de la calidad del cultivo. El análisis se llevó a cabo por el mismo método anterior en la misma institución.

La espectrofotometría de emisión óptica de plasma acoplado (ICP-AES) es una técnica analítica que es usada en la determinación de elementos químicos mediante la excitación de iones y átomos que emiten una radiación electromagnética en diferentes longitudes de onda dependiendo del elemento (Hieftje *et al.*, 1982)

El método está basado en la medición de la emisión atómica por medio de una técnica de espectroscopia óptica. Las muestras son nebulizadas y el aerosol formado es transportado hasta una antorcha de plasma, donde ocurre la excitación electrónica. Espectros de líneas de emisión atómica son disparados y posteriormente medidos por los detectores. Las señales originadas se procesan y controlan mediante un sistema informático. En el caso del Se, se mide a una longitud de 196.090 para una concentración de 1 mg/L (Norma UNE-EN ISO 1185, 1996)

## 5.7 Análisis estadístico

Todos los análisis anteriores fueron realizados por triplicado. Se utilizó el programa estadístico R para la interpretación de los datos. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente una de Tukey ( $p < 0.05$ ) para determinar diferencias significativas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Prueba de germinación

Los resultados de las pruebas de germinación se muestran en la tabla 10. A pesar de una recomendación de siembra de 2.4 kg de semilla/m<sup>2</sup> (FAO, 2001), se obtuvieron buenos resultados usando 1.8 kg de semilla/m<sup>2</sup>.

Tabla 10. Prueba de germinación

REPETICIÓN #1	REPETICIÓN #2	REPETICIÓN #3	MEDIA (%)
23/25	23/25	24/25	93.3 %

### 6.2 Fenoles totales

Los fenoles son biomoléculas secundarias que en su estructura contienen un anillo aromático unido a uno o más sustituyentes (átomos o grupo de átomos que toman el lugar de otros átomos). Los compuestos fenólicos participan en procesos bioquímicos que son importantes para la protección de las plantas contra infecciones causadas por hongos, virus, daño mecánico entre otros. El contenido total de fenoles en plantas, puede ser usado como un parámetro bioquímico como indicador en la selección de plantas conforme a su resistencia a hongos, bacterias y virus (Grososka *et al.*, 2018)

Particularmente, en el caso de alfalfa, se ha reportado que, dentro del grupo de compuestos fenólicos, existen algunos que son exudados por la raíz con el fin de incrementar la alelopatía o auto toxicidad, de modo que sea más difícil germinar a otras semillas de la misma especie (Wang, 2017)

En la tabla 11 se reportan los resultados para compuestos fenólicos totales. En general se presentó un mayor contenido fenólico en la fase de caja petri que invernadero. Esta diferencia puede ser atribuida a que durante la fase de producción en invernadero se presentaron bajas temperaturas que pudieron haber mermado la

asimilación de Se en las plantas, ya que este elemento se absorbe mejor a temperaturas mayores a 20 °C (Haygarth, 1994).

Existen diferencias significativas respecto a los valores obtenidos en ambas fases del experimento. Se puede apreciar que a medida que el porcentaje de la solución nutritiva aumenta, se hacen menos significativas las diferencias entre los tratamientos con diferentes dosis de Se (particularmente en cultivo caja petri).

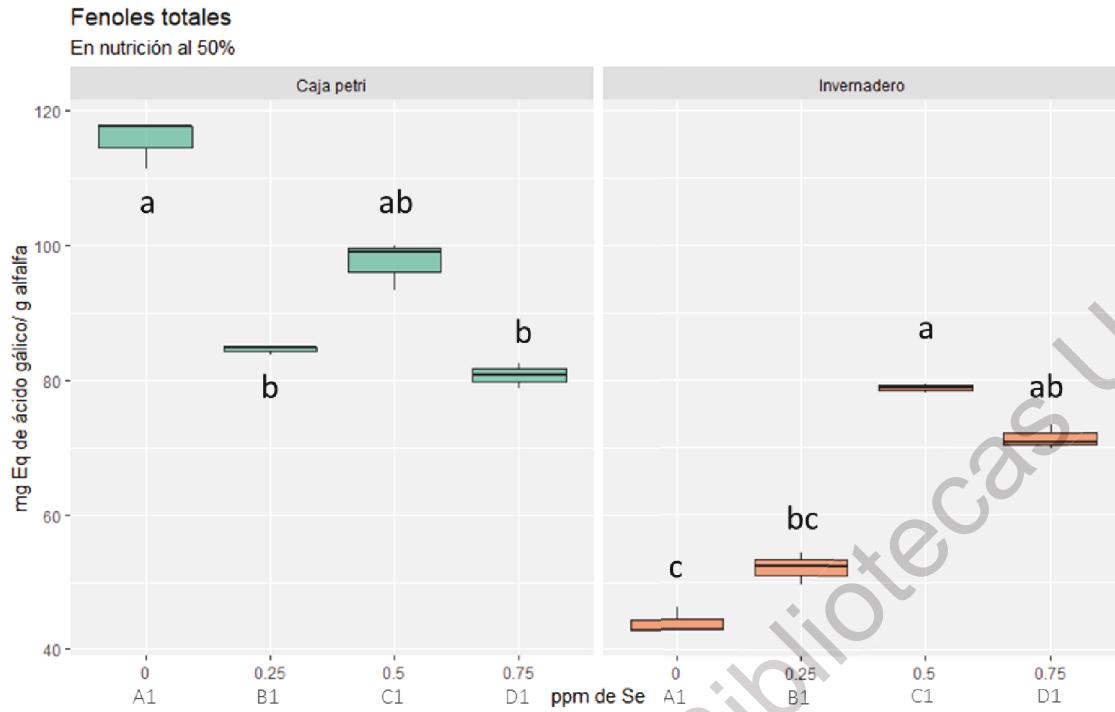
El tratamiento A1 en caja petri fue el que obtuvo mayor cantidad de compuestos fenólicos respecto a los demás tratamientos con solución nutritiva al 50%. Sin embargo, en la fase de invernadero el tratamiento A1 presentó la mejor incidencia de fenoles.

Al usar 0.75 ppm de Se con una solución nutritiva al 75% en caja petri se obtuvo una diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos, pero en invernadero el mejor resultado fue el empleo 0 ppm.

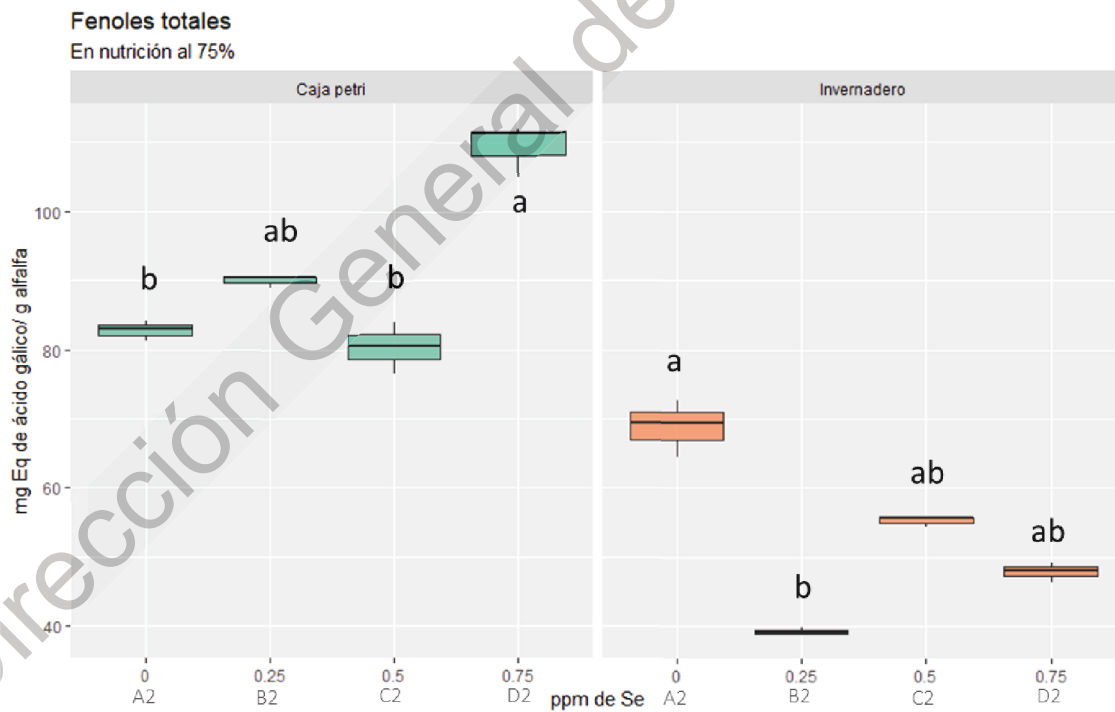
Un caso aislado se registró en la fase de invernadero en el tratamiento D3 que obtuvo el mayor contenido fenólico de los tratamientos del grupo en solución nutritiva al 100%.

**Tabla 11.** Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa ( $P \leq 0.05$ ). Los valores sombreados indican el valor máximo con diferencia significativa.

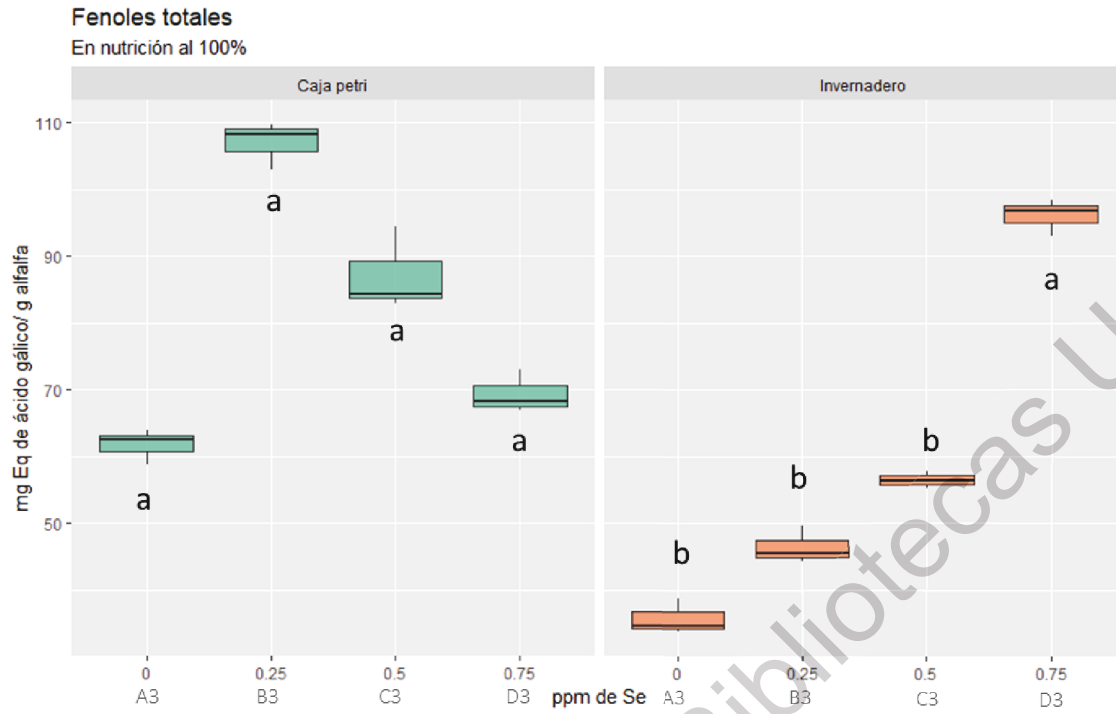
SOLUCIÓN NUTRIVA	TRATAMIENTO	ppm Se	CAJA PETRI	INVERNADERO
			mg eq de ácido gálico / g de alfalfa	mg eq de ácido gálico / g de alfalfa
50%	A1	0	115.5671 ± 3.6491 <sup>A</sup>	43.9236 ± 1.9858 <sup>C</sup>
	B1	0.25	84.4675 ± 0.7424 <sup>B</sup>	52.0601 ± 2.3754 <sup>BC</sup>
	C1	0.5	97.4189 ± 3.5843 <sup>AB</sup>	78.7152 ± 0.6486 <sup>A</sup>
	D1	0.75	80.6713 ± 1.8930 <sup>B</sup>	71.2615 ± 1.8056 <sup>AB</sup>
75%	A2	0	82.7662 ± 1.4326 <sup>B</sup>	68.8657 ± 4.1005 <sup>A</sup>
	B2	0.25	89.9652 ± 0.9027 <sup>AB</sup>	39.2824 ± 0.5337 <sup>B</sup>
	C2	0.5	80.3009 ± 3.7063 <sup>B</sup>	55.2546 ± 0.8564 <sup>AB</sup>
	D2	0.75	109.4444 ± 3.9166 <sup>A</sup>	47.9050 ± 1.4879 <sup>AB</sup>
100%	A3	0	61.7939 ± 2.6243 <sup>A</sup>	35.7870 ± 2.5996 <sup>B</sup>
	B3	0.25	107.0023 ± 3.5634 <sup>A</sup>	46.4930 ± 2.8546 <sup>B</sup>
	C3	0.5	87.2800 ± 6.2658 <sup>A</sup>	56.5509 ± 1.2848 <sup>B</sup>
	D3	0.75	69.4444 ± 3.2953 <sup>A</sup>	96.1342 ± 2.6918 <sup>A</sup>



**Figura 31.** Fenoles totales en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 32.** Fenoles totales en nutrición al 75% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 33.** Fenoles totales en nutrición al 100% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )

Dirección General de Bibliotecas UAQ



### 6.3 Flavonoides totales

Los flavonoides son el grupo más grande de fenoles que se encuentran en plantas. Representan más de la mitad de los 8 mil compuestos fenólicos naturales identificados (Harborne *et al.*, 1999). Protegen a las plantas de estrés biótico y abiótico y actúan como filtros de radiación UV. (Takashi y Ohnishi, 2004). También juegan un papel muy importante en la capacidad de las plantas a adaptarse a diferentes climas y mejoran la tolerancia al frío (Amalesh *et al.*, 2011). De igual manera, son considerados como componente indispensable en numerosas aplicaciones nutraceuticas, farmacéuticas, médicas y cosméticas debido a sus propiedades antioxidativas, antiinflamatorias, antimutagénicas, y anticancerígenas (Panche *et al.*, 2016).

En la tabla 12, es posible distinguir que el tratamiento D1 fue el único que obtuvo una diferencia respecto a los demás tratamientos con Se en la fase de caja petri. En los demás tratamientos con soluciones nutritivas al 75 y 100 % los valores fueron muy parecidos entre sí.

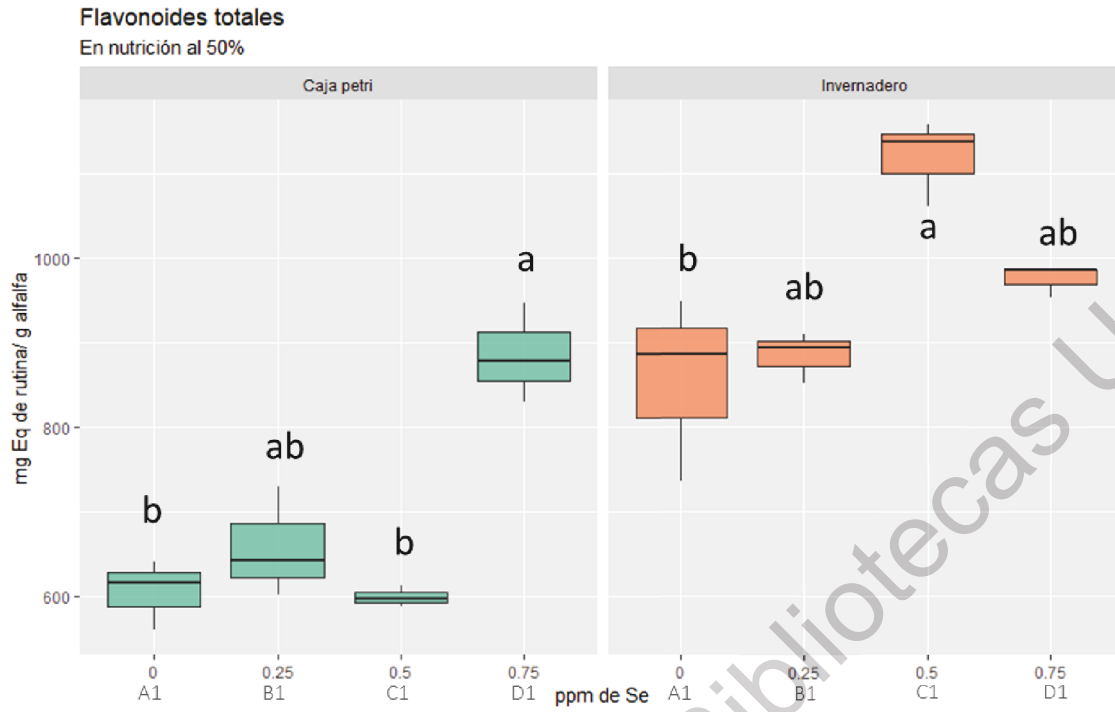
En la fase de invernadero, los datos tuvieron un comportamiento similar, puesto que conforme incrementaba el porcentaje de solución nutritiva en los tratamientos, dejaba de existir diferencia significativa.

En ambas fases, los valores destacados radicaron en los tratamientos con 50 % de solución nutritiva, indicando así que, a menor cantidad de nutrientes disponibles para la planta, mayor es la expresión de flavonoides.

El alto índice de flavonoides en los tratamientos D1 y C1 en caja petri e invernadero respectivamente, puede estar relacionado con la presencia de selenio y también puede ser parte de una respuesta a un estrés nutrimental.

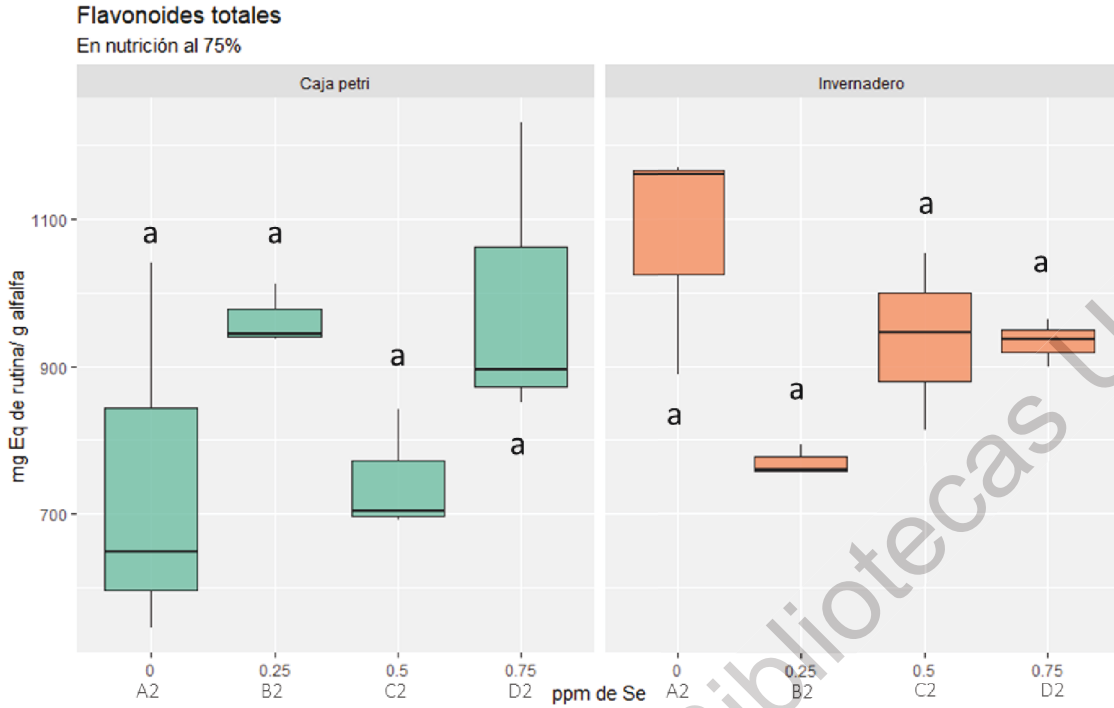
**Tabla 12.** Cuantificación de flavonoides presentes en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa ( $P \leq 0.05$ ). Los valores sombreados señalan el valor máximo con diferencia significativa de cada fase.

SOLUCIÓN NUTRIVA	TRATAMIENTO	ppm Se	CAJA PETRI	INVERNADERO
			mg eq de rutina / g de alfalfa	mg eq de rutina / g de alfalfa
50%	A1	0	604.8810 ± 41.2594 <sup>B</sup>	856.6667 ± 109.0136 <sup>B</sup>
	B1	0.25	657.50 ± 66.0598 <sup>AB</sup>	884.2857 ± 29.7716 <sup>AB</sup>
	C1	0.5	599.1667 ± 12.6689 <sup>B</sup>	1118.0952 ± 50.6895 <sup>A</sup>
	D1	0.75	884.6429 ± 59.1907 <sup>A</sup>	974.7619 ± 19.0003 <sup>AB</sup>
75%	A2	0	744.6429 ± 261.0118 <sup>A</sup>	1072.9762 ± 160.0567 <sup>A</sup>
	B2	0.25	964.1667 ± 41.7174 <sup>A</sup>	770.1190 ± 20.4051 <sup>A</sup>
	C2	0.5	745.4762 ± 83.0803 <sup>A</sup>	937.5 ± 119.9973 <sup>A</sup>
	D2	0.75	991.7857 ± 207.5036 <sup>A</sup>	933.0952 ± 31.9784 <sup>A</sup>
100%	A3	0	753.9286 ± 90.0389 <sup>A</sup>	1069.6429 ± 51.5561 <sup>A</sup>
	B3	0.25	744.0476 ± 10.3160 <sup>A</sup>	1082.2619 ± 5.2286 <sup>A</sup>
	C3	0.5	785.2381 ± 61.4932 <sup>A</sup>	898.0952 ± 146.8045 <sup>A</sup>
	D3	0.75	786.0714 ± 32.1686 <sup>A</sup>	1032.3810 ± 61.09037 <sup>A</sup>

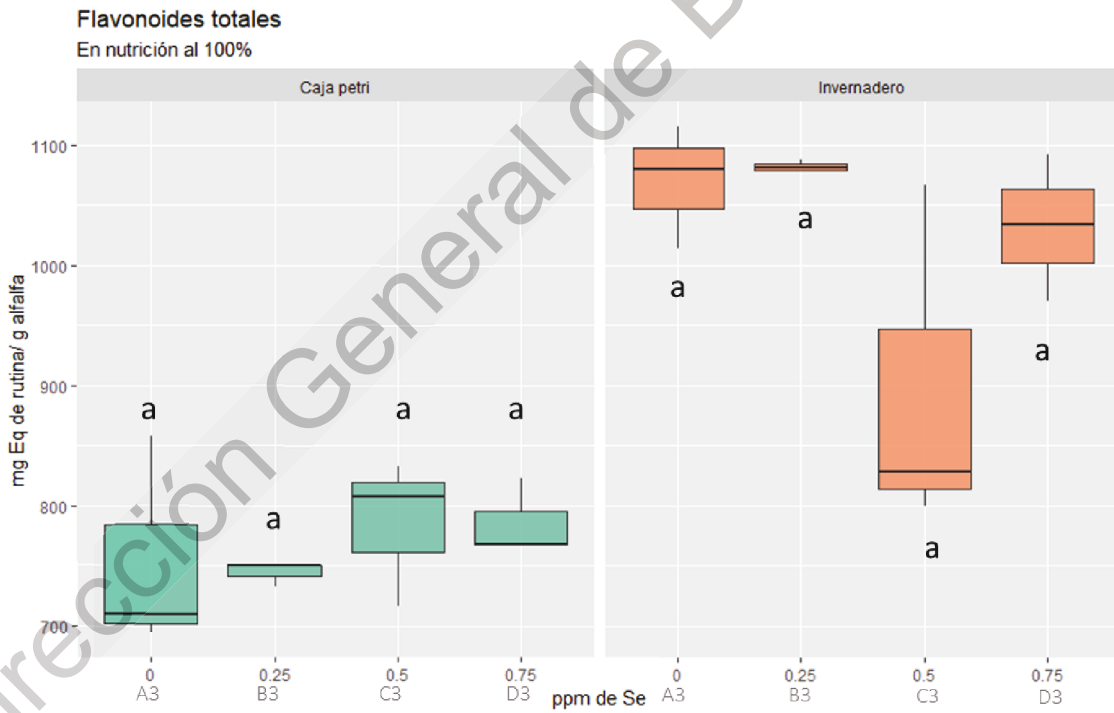


**Figura 34.** Flavonoides totales en nutrición al 50% en ambas fases del experimento. ( $P \leq 0.05$ )

Dirección General de Bibliotecas UAQ



**Figura 35.** Flavonoides totales en nutrición al 75% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 36.** Flavonoides totales en nutrición al 100% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )

## 6.4 Capacidad antioxidante DPPH

Los antioxidantes son sustancias que impiden, retrasan o inhiben los procesos que inducen la formación de radicales libres que, si se encuentran en un alto nivel, pueden dañar la estructura de las biomoléculas y modificar sus funciones, ocasionando una disfunción e incluso muerte celular (Grune *et al.*, 2001).

En animales, es de particular importancia procurar la ingesta de antioxidantes, ya que está estrechamente relacionada con la salud y la capacidad de producción, así como la prevención de enfermedades al fortalecer el sistema inmunológico (Boon, 1996).

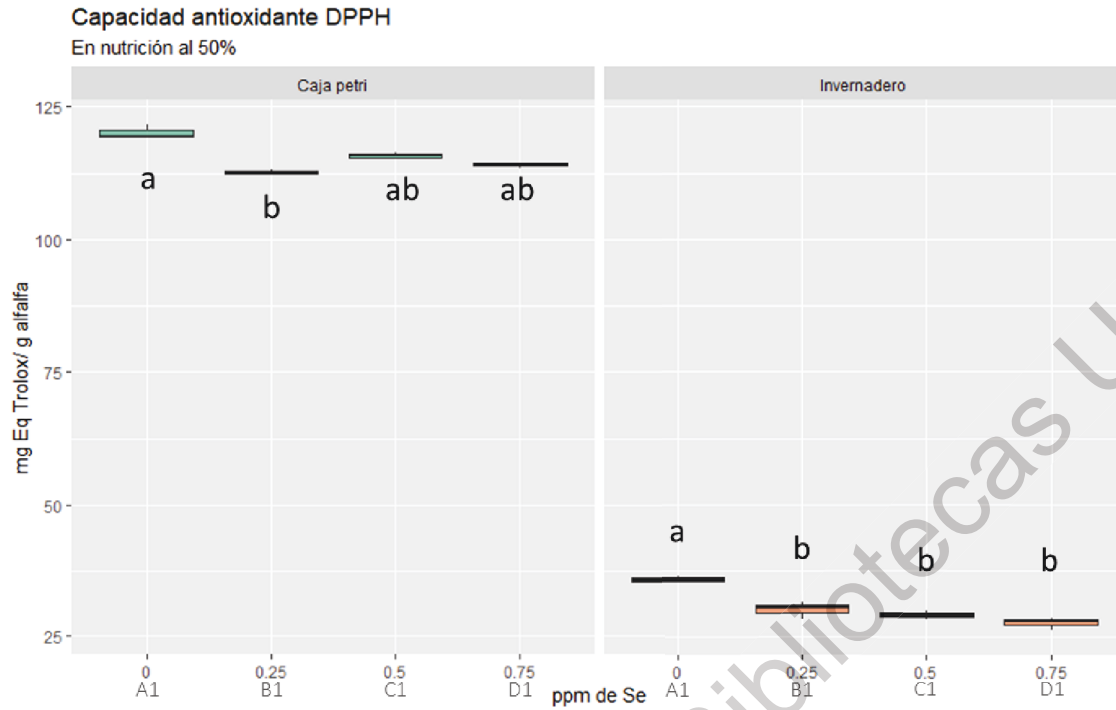
La prueba DPPH evalúa el potencial para contrarrestar radicales libres por las moléculas antioxidantes del compuesto a analizar (Cheng *et al.*, 2006). La capacidad antioxidante para el radical DPPH fue mayor en tratamientos de 0 ppm de Se (Tabla 13), coincidiendo con un estudio anterior llevado a cabo por Woch y Hawrylak-Nowak (2019) en alfalfa con diferentes tratamientos de selenio (20  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ ). En este estudio se pudo observar que la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de selenito y de selenato, provocan un ligero decremento en la cuantificación de actividad antioxidante en alfalfa, mientras que en otros cultivos como el rábano y mostaza blanca lo incrementan.

Efectos positivos en la determinación de compuestos antioxidantes en hojas de olivo asperjadas foliarmente con Se, han sido reportados. Sin embargo, cabe señalar que se empleó una dosis de 100 mg /Kg de Se (Mattioli *et al.*, 2019).

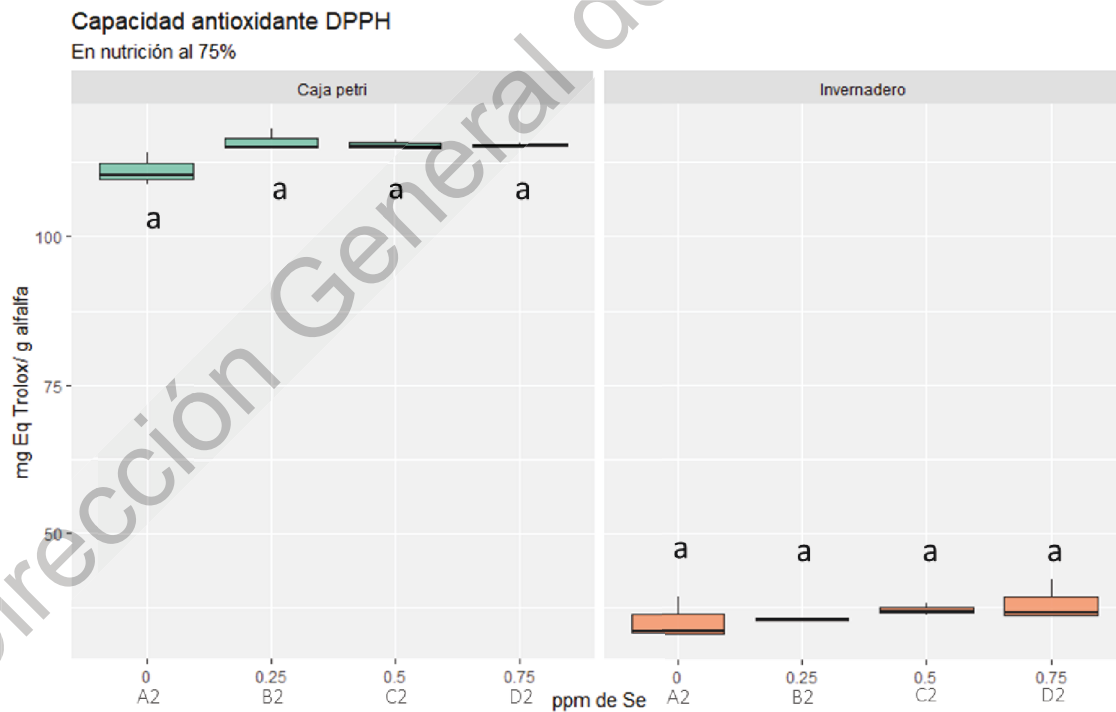
Nuevamente se observó que, al aumentar el porcentaje de solución nutritiva, dejaba de haber diferencia significativa entre los tratamientos con Se. En la fase de caja petri, se cuantificó una mayor presencia de elementos antioxidantes que en la de invernadero (Tabla 13 y 14).

**Tabla 13.** Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase ( $P \leq 0.05$ )

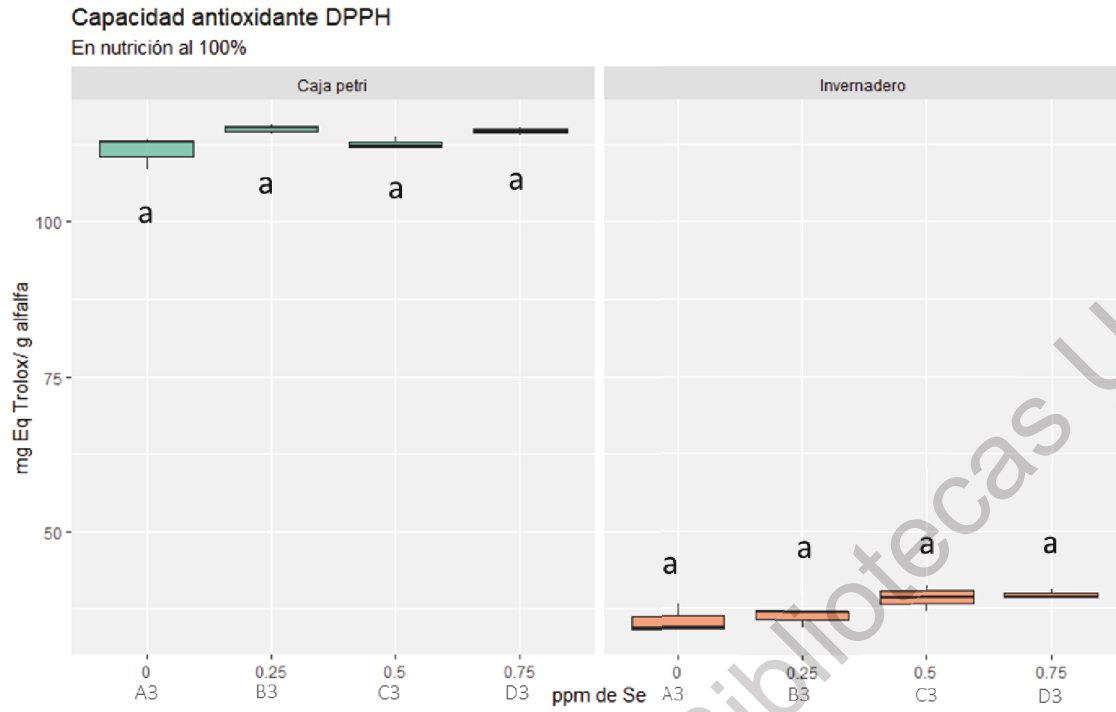
SOLUCIÓN NUTRIVA	TRATAMIENTO	ppm Se	CAJA PETRI	INVERNADERO
			mg eq de trolox / g de muestra	mg eq de trolox / g de muestra
50%	A1	0	120.1077 ± 1.2642 <sup>A</sup>	35.8564 ± 0.6507 <sup>A</sup>
	B1	0.25	112.6599 ± 0.4983 <sup>AB</sup>	30.1713 ± 1.5909 <sup>B</sup>
	C1	0.5	115.8916 ± 0.6801 <sup>AB</sup>	29.1412 ± 0.8850 <sup>B</sup>
	D1	0.75	114.0516 ± 0.467 <sup>B</sup>	27.6667 ± 1.1419 <sup>B</sup>
75%	A2	0	111.1066 ± 2.7182 <sup>A</sup>	35.2368 ± 3.5193 <sup>A</sup>
	B2	0.25	116.0224 ± 1.7789 <sup>A</sup>	35.4455 ± 0.3780 <sup>A</sup>
	C2	0.5	115.4837 ± 0.7465 <sup>A</sup>	37.1133 ± 0.9535 <sup>A</sup>
	D2	0.75	115.4972 ± 2902 <sup>A</sup>	38.3007 ± 3.4580 <sup>A</sup>
100%	A3	0	111.5241 ± 2.7081 <sup>A</sup>	35.5084 ± 2.2702 <sup>A</sup>
	B3	0.25	115.0079 ± 0.8046 <sup>A</sup>	36.1010 ± 1.4856 <sup>A</sup>
	C3	0.5	112.6420 ± 1.0105 <sup>A</sup>	39.0841 ± 2.1486 <sup>A</sup>
	D3	0.75	114.6846 ± 0.6262 <sup>A</sup>	39.6206 ± 0.8020 <sup>A</sup>



**Figura 37.** Capacidad antioxidante DPPH en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 38.** Capacidad antioxidante DPPH en nutrición al 75 % en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 39.** Capacidad antioxidante DPPH en nutrición al 100% en ambas fases del experimento Tuckey ( $P \leq 0.05$ ).

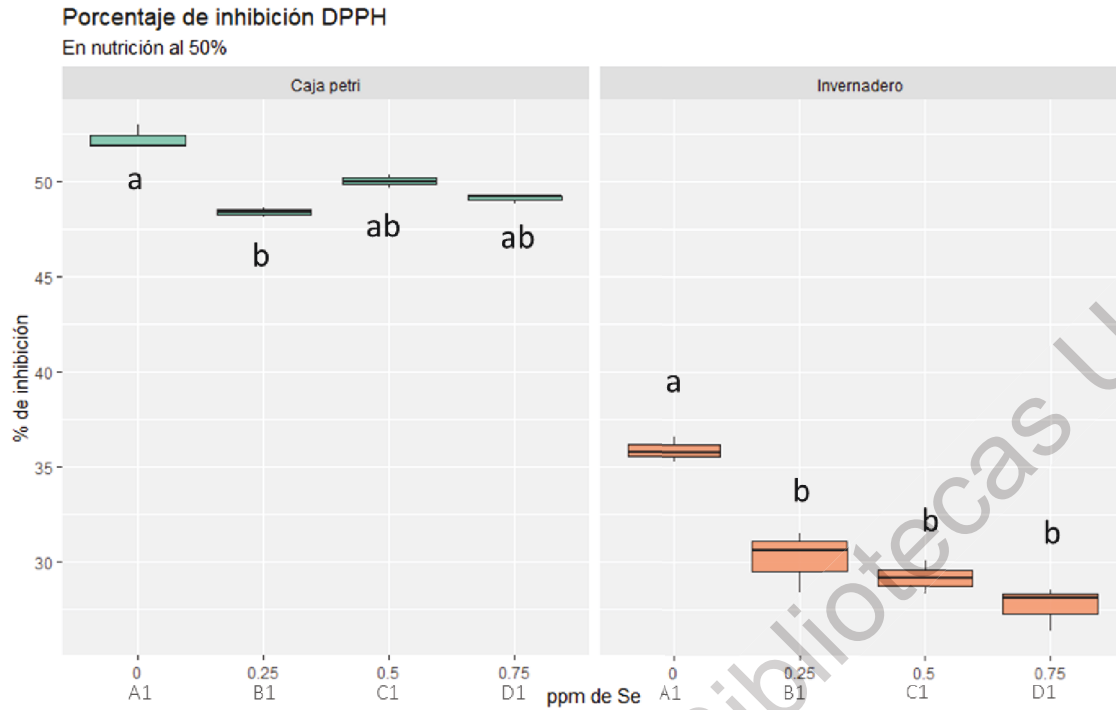
Dirección General de Bibliotecas UAQ



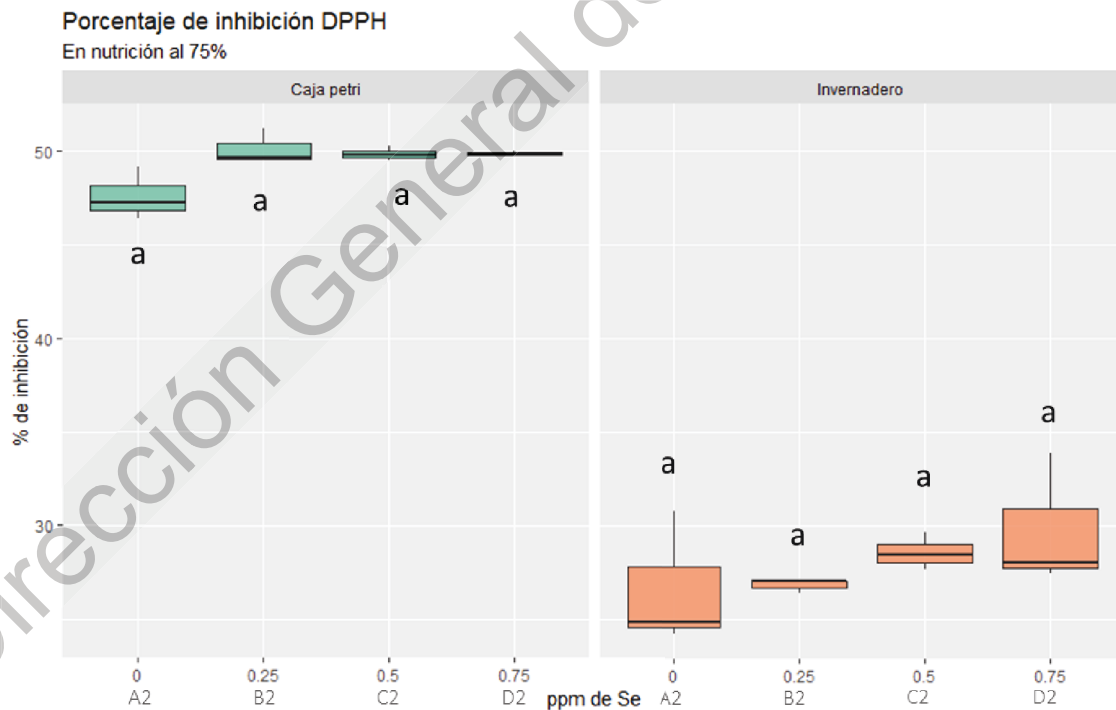
## 6.4.1 Porcentaje de inhibición DPPH

**Tabla 14.** Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase ( $P \leq 0.05$ ).

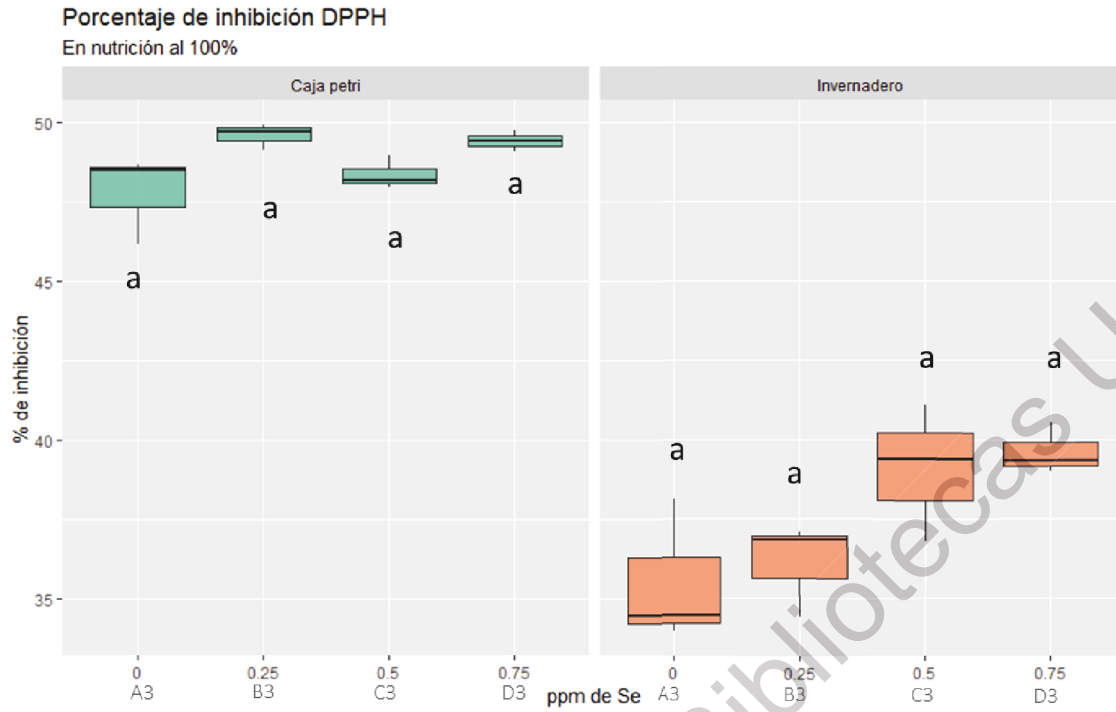
SOLUCIÓN NUTRIVA	TRATAMIENTO	ppm Se	CAJA PETRI % inhibición	INVERNADERO %inhibición
50%	A1	0	52.2152 ± 0.6518 <sup>A</sup>	35.8564 ± 0.6507 <sup>A</sup>
	B1	0.25	48.375 ± 0.2569 <sup>B</sup>	30.1713 ± 1.5909 <sup>B</sup>
	C1	0.5	50.0104 ± 0.3506 <sup>AB</sup>	29.1412 ± 0.8750 <sup>B</sup>
	D1	0.75	49.0925 ± 0.2509 <sup>AB</sup>	27.6666 ± 1.1419 <sup>B</sup>
75%	A2	0	47.5740 ± 1.4015 <sup>A</sup>	26.6226 ± 3.6293 <sup>A</sup>
	B2	0.25	50.1088 ± 0.9172 <sup>A</sup>	26.8379 ± 0.3899 <sup>A</sup>
	C2	0.5	49.8310 ± 0.3849 <sup>A</sup>	28.5578 ± 0.9833 <sup>A</sup>
	D2	0.75	49.8379 ± 0.1496 <sup>A</sup>	29.7824 ± 3.5660 <sup>A</sup>
100%	A3	0	47.7893 ± 1.3964 <sup>A</sup>	35.5084 ± 2.2702 <sup>A</sup>
	B3	0.25	49.5856 ± 0.4148 <sup>A</sup>	36.1010 ± 1.4856 <sup>A</sup>
	C3	0.5	48.3657 ± 0.5210 <sup>A</sup>	39.0841 ± 2.1486 <sup>A</sup>
	D3	0.75	49.4189 ± 0.3229 <sup>A</sup>	39.6206 ± 0.8020 <sup>A</sup>



**Figura 40.** Porcentaje de inhibición del radical DPPH al 50% de nutrición en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 41.** Porcentaje de inhibición del radical DPPH al 75% de nutrición en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 42.** Porcentaje de inhibición del radical DPPH al 75% de nutrición en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 6.5 Capacidad antioxidante ABTS

La prueba ABTS está basada en la generación del radical ABTS<sup>+</sup>, que puede ser reducido por los antioxidantes del compuesto a analizar (Floegel *et al.*, 2011). Esta prueba es aplicable a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (León-Martínez *et al.*, 2015).

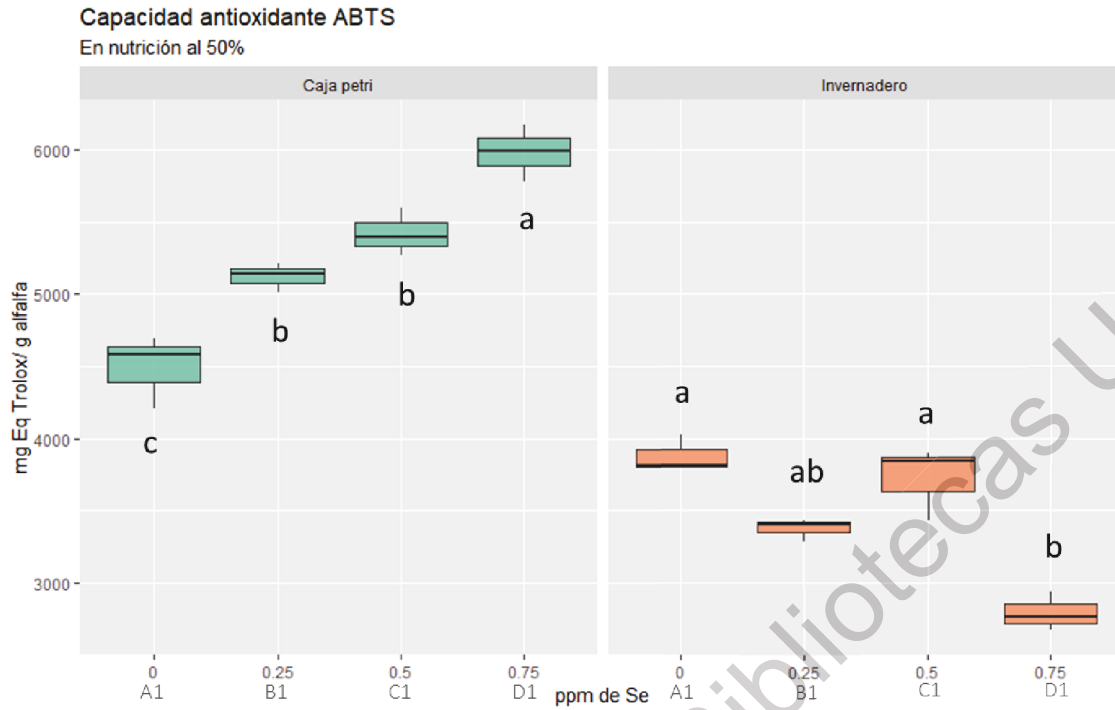
Se registró el máximo nivel de capacidad antioxidante en el tratamiento D1 con 0.75 ppm de Se, obtenido casi un 83% de inhibición del radical (Tabla 16) y se refleja una diferencia significativa respecto a los demás tratamientos dentro de la solución nutritiva al 50% (Tabla 15). Este resultado coincide con Won-Yeong *et al.* (2018) donde suministraron una dosis de 2 ppm a plantas de espinaca y encontraron un aumento de capacidad antioxidante ABTS y DPPH, con un porcentaje de inhibición promedio de 40.36 % y 52.30 %.

Los resultados que corresponden a los tratamientos B1, C1 y D1 (con Se y al 50% de solución nutritiva) en caja petri, demuestran que es posible superar la capacidad antioxidante de los tratamientos acondicionados con una solución nutritiva al 100% (Tabla 15)

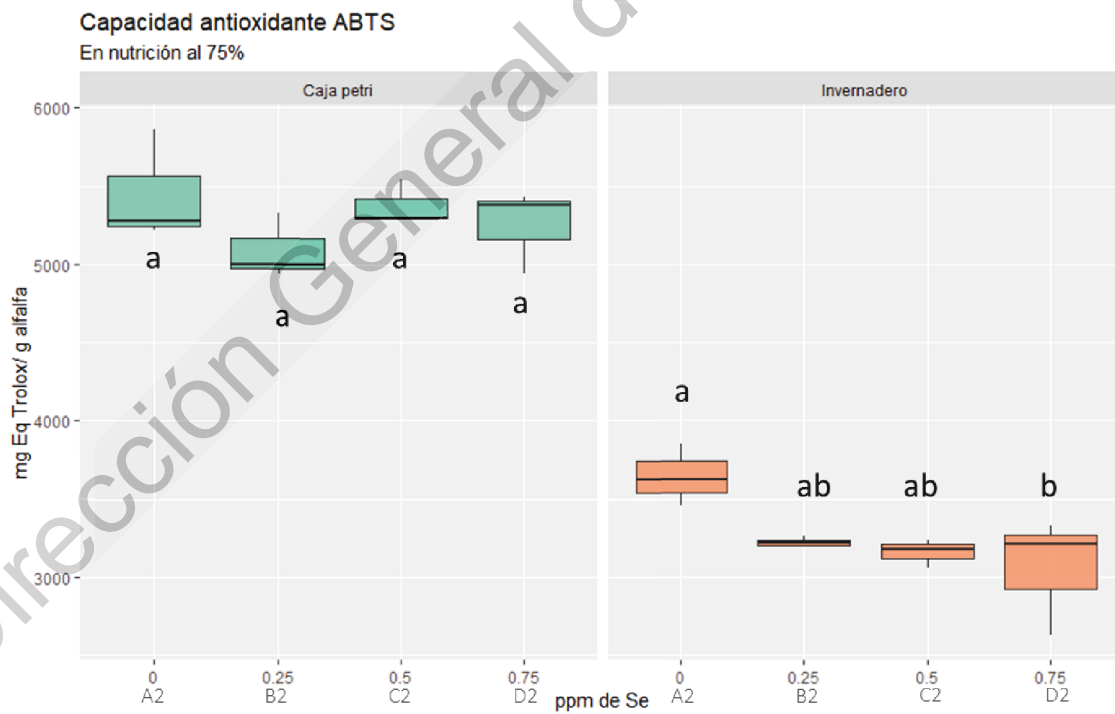
En el caso de la fase en invernadero, se obtuvieron los valores de actividad antioxidante más altos con la nutrición al 50%, siendo estos los tratamientos A1 y C1 sin existir diferencia significativa entre ellos. La diferencia las diferentes fases del experimento (Caja petri e invernadero) refleja cómo las condiciones ambientales repercuten la expresión de compuestos antioxidantes en la planta.

**Tabla 15.** Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase ( $P \leq 0.05$ ).

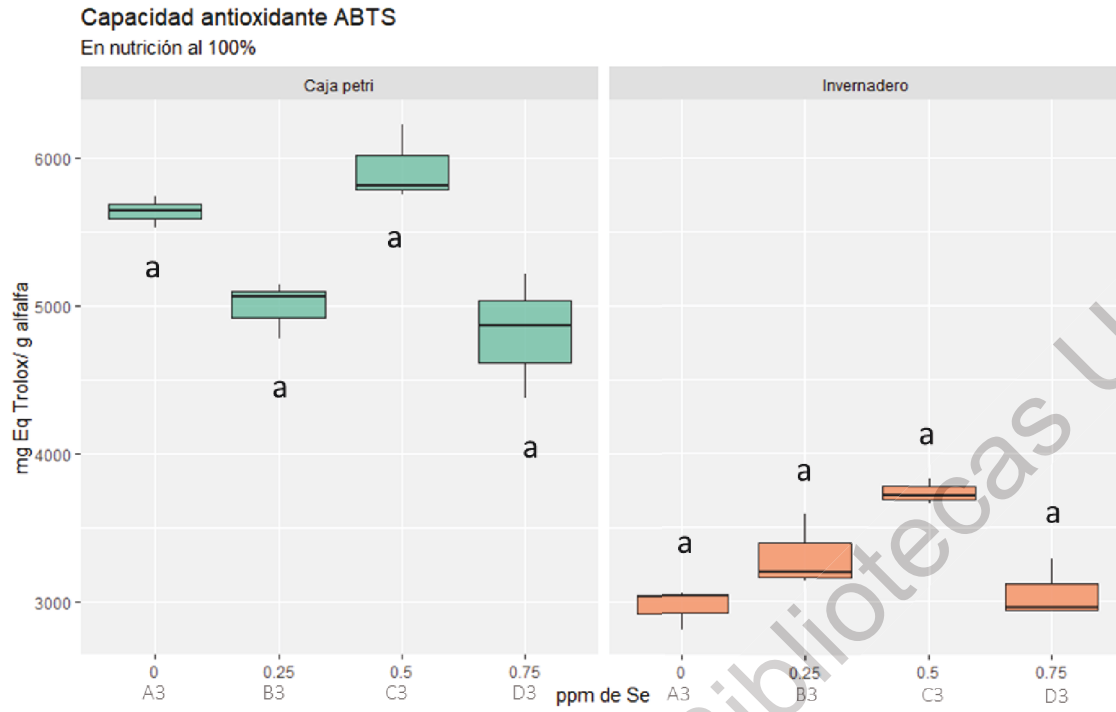
SOLUCIÓN NUTRIVA	TRATAMIENTO	ppm Se	CAJA PETRI mg eq de trolox / g de muestra	INVERNADERO mg eq de trolox / g de muestra
50%	A1	0	4492.500 ± 257.2787 <sup>C</sup>	3878.056 ± 129.0573 <sup>A</sup>
	B1	0.25	5120.556 ± 98.1861 <sup>B</sup>	3373.333 ± 78.0357 <sup>AB</sup>
	C1	0.5	5418.333 ± 165.9087 <sup>B</sup>	3720.278 ± 255.8025 <sup>A</sup>
	D1	0.75	5981.944 ± 194.0088 <sup>A</sup>	2791.389 ± 135.1191 <sup>B</sup>
75%	A2	0	5451.111 ± 353.7353 <sup>A</sup>	3646.389 ± 198.1462 <sup>A</sup>
	B2	0.25	5091.111 ± 206.7277 <sup>A</sup>	3223.333 ± 33.3645 <sup>AB</sup>
	C2	0.5	5379.722 ± 143.8564 <sup>A</sup>	3156.389 ± 92.381 <sup>AB</sup>
	D2	0.75	5249.722 ± 271.3973 <sup>A</sup>	3057.222 ± 374.4267 <sup>B</sup>
100%	A3	0	5635.278 ± 106.0180 <sup>A</sup>	2960.278 ± 137.005 <sup>A</sup>
	B3	0.25	4989.722 ± 192.6791 <sup>A</sup>	3301.111 ± 247.8859 <sup>A</sup>
	C3	0.5	5927.5 ± 255.4422 <sup>A</sup>	3732.778 ± 87.7588 <sup>A</sup>
	D3	0.75	4814.444 ± 421.8489 <sup>A</sup>	3053.889 ± 200.4878 <sup>A</sup>



**Figura 43.** Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 44.** Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 75% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 45.** Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 100% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )

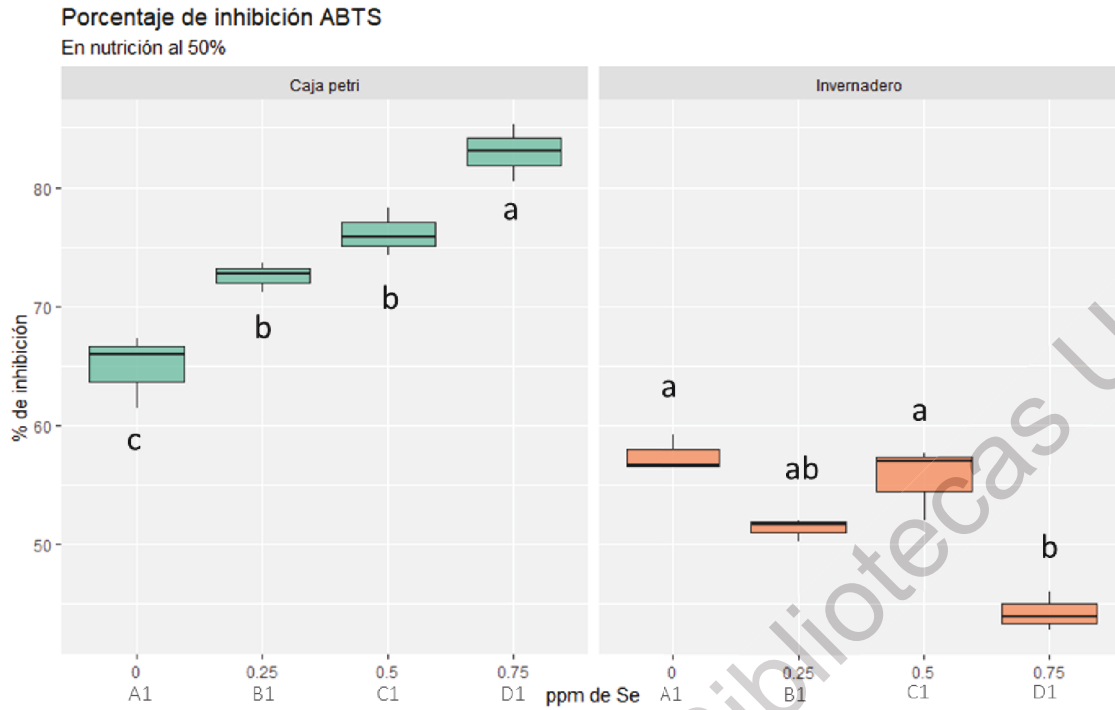
Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 6.5.1 Porcentaje de inhibición ABTS

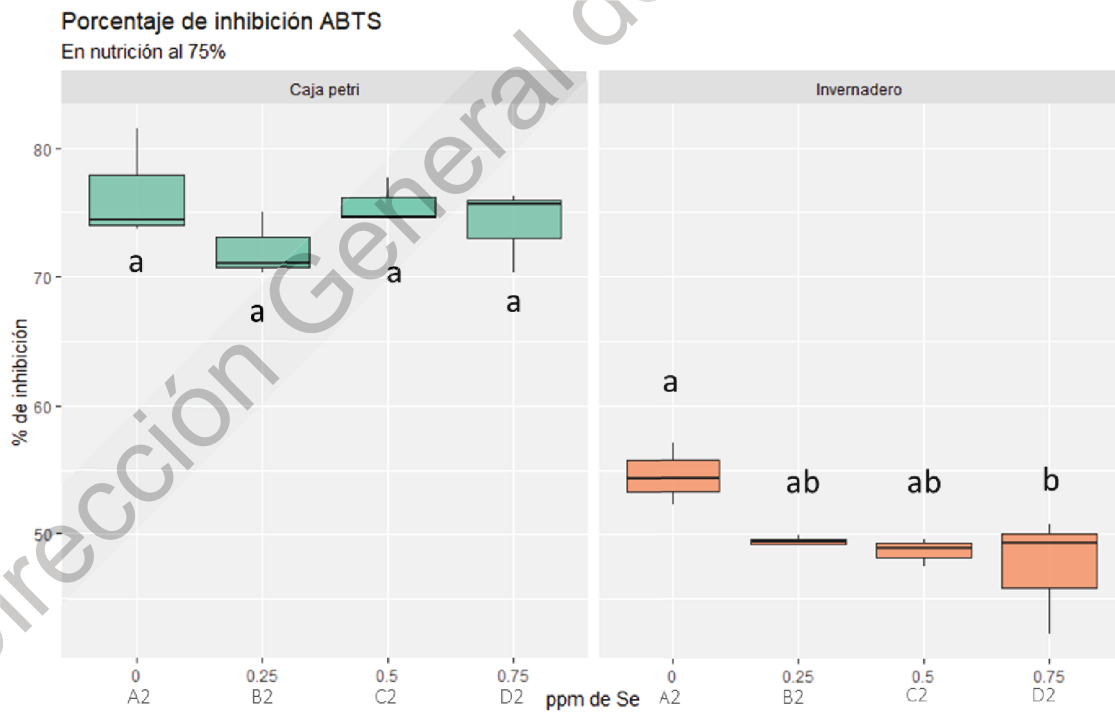
**Tabla 16.** Determinación del porcentaje de inhibición del radical ABTS en los diferentes tratamientos de muestras de alfalfa. Los valores sombreados señalan el valor máximo obtenido en cada fase ( $P \leq 0.05$ ).

SOLUCIÓN NUTRIVA	TRATAMIENTO	ppm Se	CAJA PETRI % inhibición	INVERNADERO %inhibición
50%	A1	0	64.8867 ± 3.1223 <sup>C</sup>	57.4298 ± 1.5662 <sup>A</sup>
	B1	0.25	72.5087 ± 1.1915 <sup>B</sup>	51.3046 ± 0.9470 <sup>AB</sup>
	C1	0.5	76.1225 ± 2.6134 <sup>B</sup>	55.5151 ± 3.1044 <sup>A</sup>
	D1	0.75	82.9625 ± 2.3543 <sup>A</sup>	44.2421 ± 1.6327 <sup>B</sup>
75%	A2	0	76.5203 ± 4.2929 <sup>A</sup>	54.6183 ± 2.4050 <sup>A</sup>
	B2	0.25	72.1514 ± 2.5088 <sup>A</sup>	49.4842 ± 0.4049 <sup>AB</sup>
	C2	0.5	75.6539 ± 1.7458 <sup>A</sup>	48.6717 ± 1.1211 <sup>AB</sup>
	D2	0.75	74.0763 ± 3.2936 <sup>A</sup>	47.4683 ± 4.5440 <sup>B</sup>
100%	A3	0	78.7553 ± 1.2866 <sup>A</sup>	35.5084 ± 2.2702 <sup>A</sup>
	B3	0.25	70.9209 ± 2.3383 <sup>A</sup>	50.4281 ± 3.0083 <sup>A</sup>
	C3	0.5	82.3017 ± 3.1006 <sup>A</sup>	55.6668 ± 1.0650 <sup>A</sup>
	D3	0.75	68.7938 ± 5.1195 <sup>A</sup>	47.4278 ± 2.4331 <sup>A</sup>

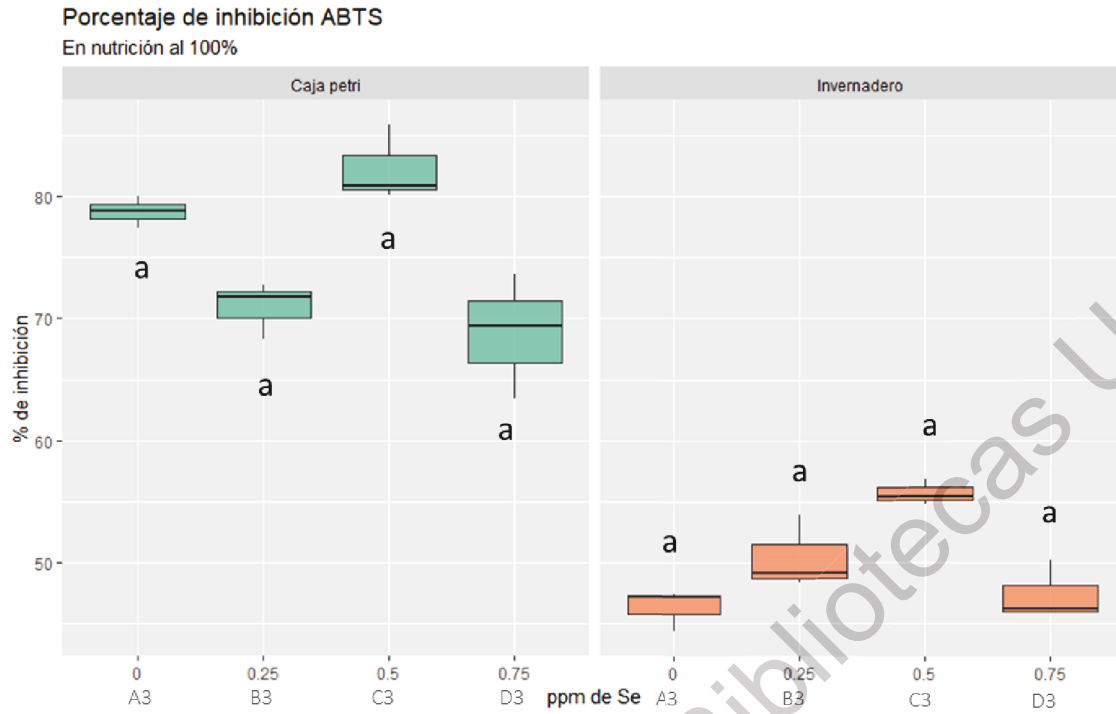




**Figura 46.** Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 47.** Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 75% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 48.** Capacidad antioxidante ABTS en nutrición al 50% en ambas fases del experimento ( $P \leq 0.05$ ).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 6.6 Selenio y Fósforo total

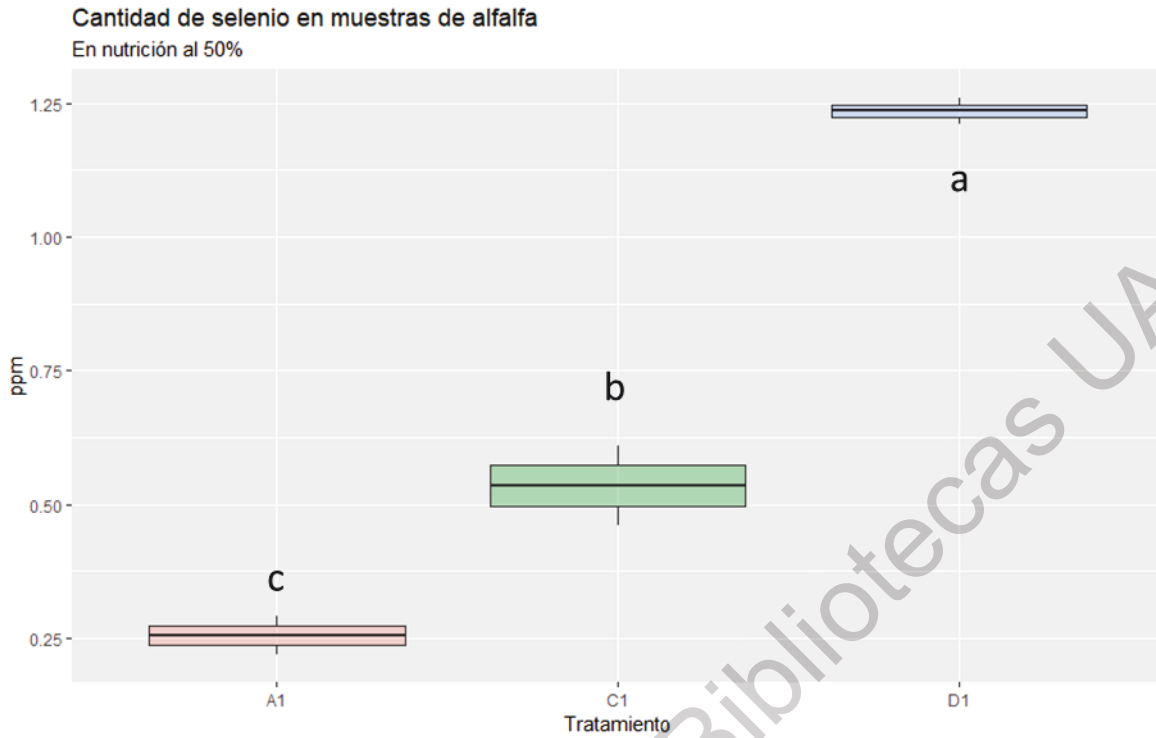
De acuerdo a los análisis anteriores, se seleccionaron los tres tratamientos que tuvieron más relevancia de acuerdo a sus propiedades, siendo estos A1, C1 y D1, todos correspondientes a la fase de cultivo en caja petri. Se optó por analizar los tratamientos de esta fase, debido a que el cultivo se llevó a cabo en condiciones más favorables que en invernadero.

La concentración de Se en las muestras de alfalfa, corresponde con la dosificación que se les fue aplicada. Fue posible incrementar la presencia de Se 4.8 veces con el tratamiento D1 (0.75 ppm solución nutritiva al 50% de solución nutritiva), obteniendo un mayor rendimiento que Won-Yeong *et al.*, (2018) que con 2 ppm de Se en plantas de espinaca lograron incrementar la cantidad de Se 3.9 veces, con una concentración final de 0.61 mg/kg. Mattioli *et al.*, (2019) reportaron un incremento de cantidad de Se en hojas de olivo de 0.15 ppm a 2.16 ppm asperjando una solución de 100 ppm de Se.

En el caso del fósforo, se presenta en mayor medida en el tratamiento A1 donde no fue suministrado Se. La interacción entre el Se y P es evidente, pues se ha reportado que son elementos antagónicos y la presencia de P disminuye la absorción de Se y viceversa (Liu *et al.*, 2004, Lévesque 1974).

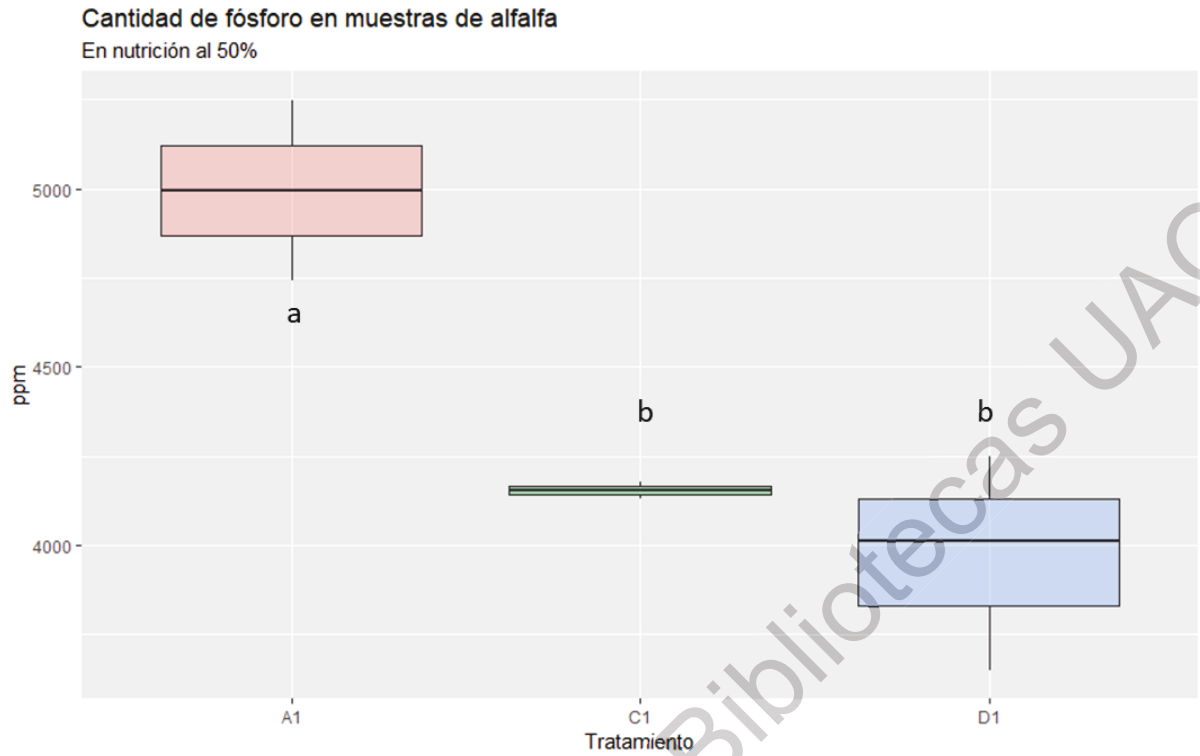
**Tabla 17.** Concentración total de Se y P en muestras de alfalfa en peso seco. Los tratamientos corresponden a la solución nutritiva al 50% ( $P \leq 0.05$ )

TRATAMIENTOS EN CAJA PETRI EN NUTRICIÓN AL 50%	Se EN SOLUCIÓN NUTRITIVA (ppm)	Se ppm en muestras de alfalfa (peso seco)	P ppm en muestras de alfalfa (peso seco)
A1	0	$0.255 \pm 0.0352^C$	$4995.890 \pm 252.43^A$
C1	0.5	$0.535 \pm 0.075^B$	$4153.722 \pm 22.025^B$
D1	0.75	$1.235 \pm 0.025^A$	$3970. \pm 301.5311^B$



**Figura 49.** Concentración total de Se expresada en ppm de peso seco de muestras de alfalfa. Los tratamientos corresponden a la solución nutritiva al 50% ( $P \leq 0.05$ ).

Dirección General de Bibliotecas UAQ



**Figura 50.** Concentración total de P expresada en ppm de peso seco de muestras de alfalfa. Los tratamientos corresponden a la solución nutritiva al 50 % ( $P \leq 0.05$ ).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 7. CONCLUSIONES

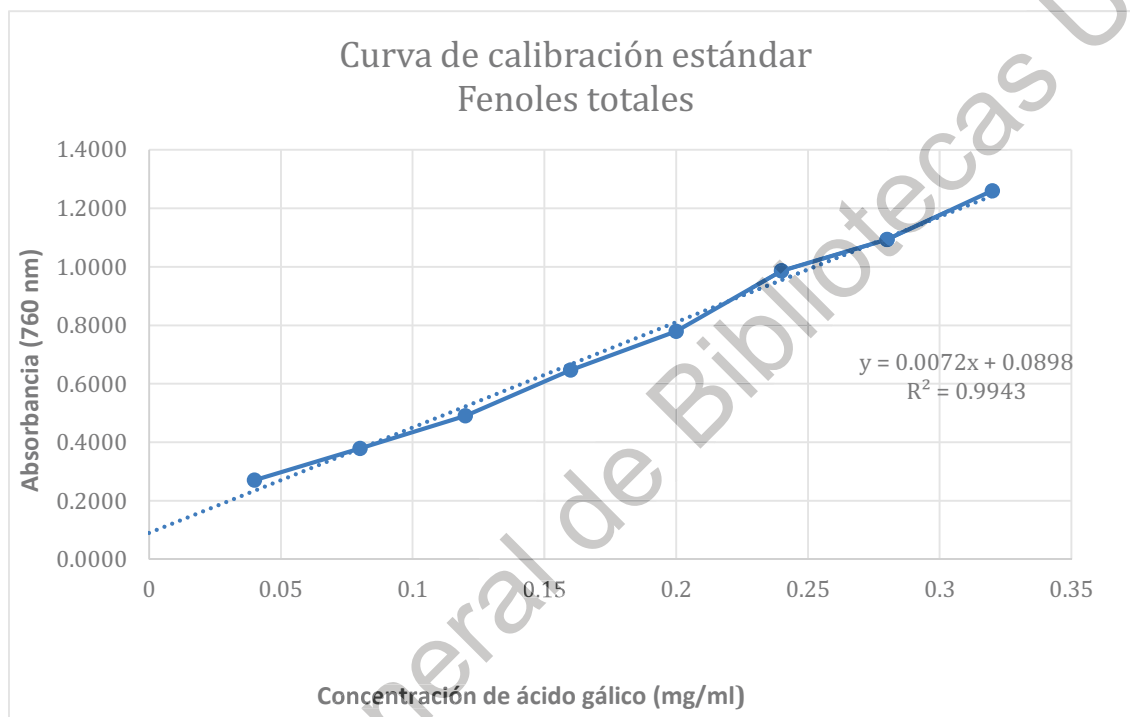
Los resultados más relevantes para calidad antioxidante de las plantas de alfalfa adicionadas con selenio, se presentaron cuando la concentración de la solución nutritiva se redujo al 50 %. El tratamiento con selenio que destacó por su mayor actividad antiradical ABTS y en contenido de flavonoides fue el D1 (0.75 ppm Se). Por lo que la hipótesis fue verdadera en las condiciones anteriormente descritas.

La adición de selenio en la solución nutritiva para forraje verde hidropónico, incrementó la acumulación de este elemento en la biomasa. El consumo de forraje verde hidropónico desarrollado en este trabajo, no representa riesgo de intoxicación para el ganado, ya que no sobrepasa 5 ppm de Se y los tratamientos C1 y D1 con 0.5 ppm y 0.75 ppm respectivamente, superaron el contenido promedio en forrajes.

En comparación con otros métodos de suplementación descritos en la literatura, esta forma de biofortificación es económica, rápida y fácil de implementar. Sin embargo, en términos de valor nutracéutico se recomienda incrementar la dosis de Se para poder percibir mayor calidad antioxidante. De igual manera, se hace especial énfasis en contemplar al Se como posible factor para reducir el uso de fertilizantes en futuras investigaciones.

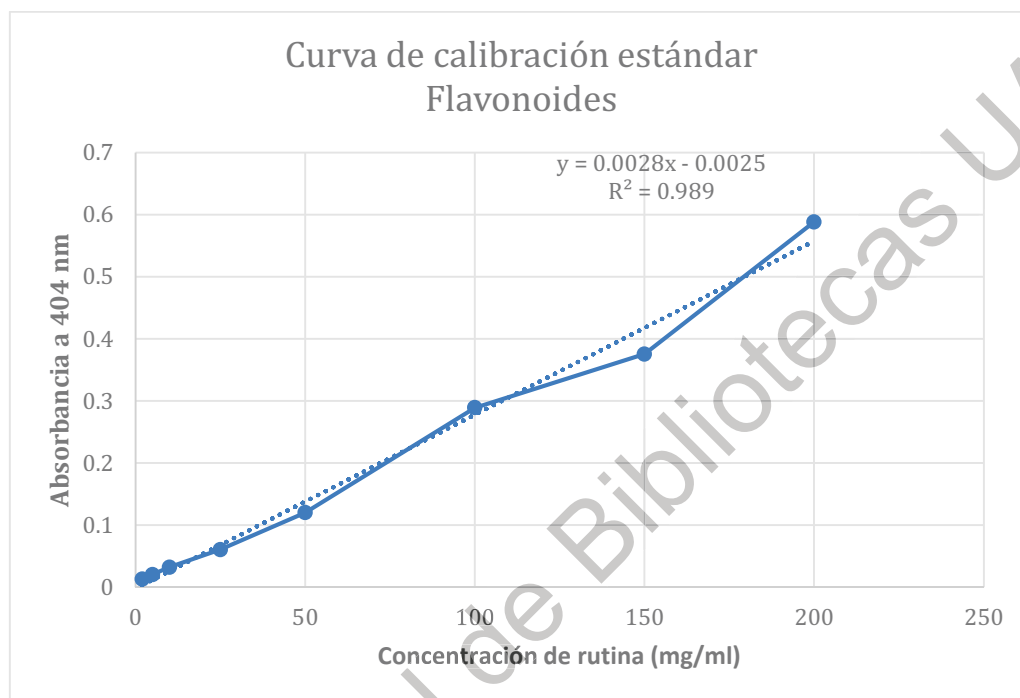
## 8. ANEXOS

### 8.1 Curva de calibración para la determinación de fenoles totales



**Figura 51.** Curva estándar para la cuantificación de fenoles totales

## 8.2 Curva de calibración para la determinación de flavonoides



**Figura 52.** Curva estándar para la cuantificación de flavonoides totales



### 8.3 Curvas de calibración para la determinación de actividad antioxidante (DPPH)

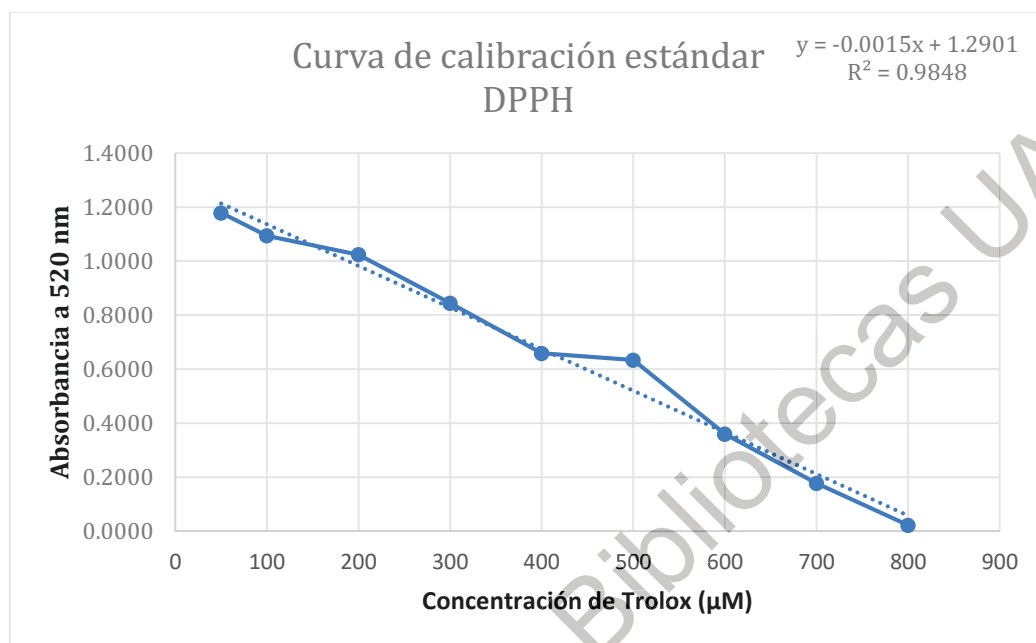


Figura 53. Curva estándar para la cuantificación de actividad antioxidante DPPH

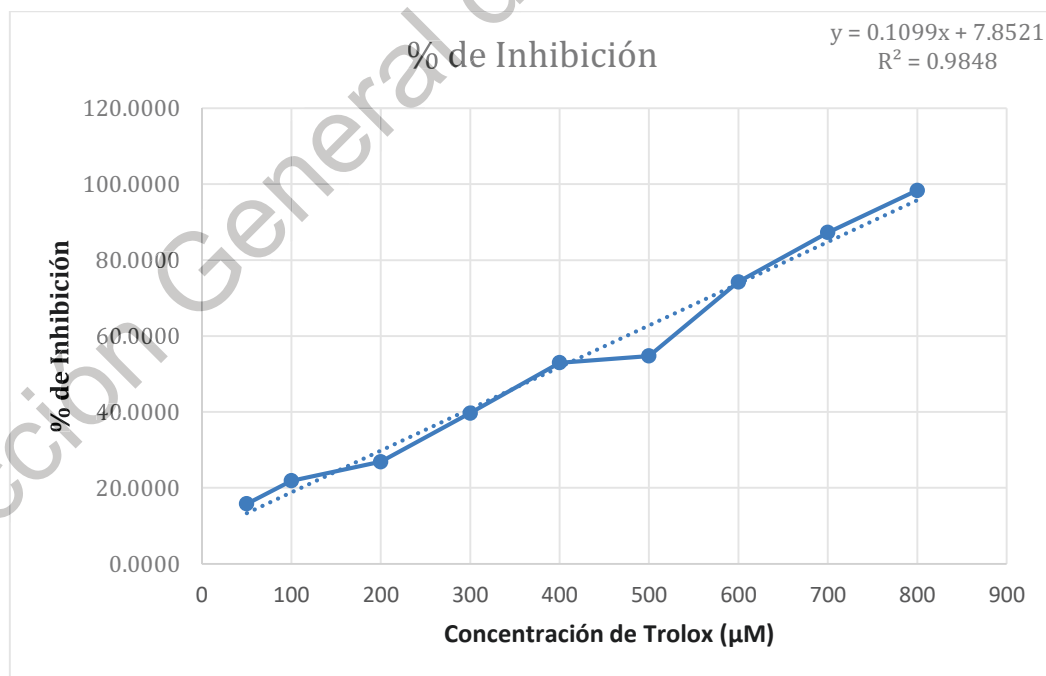


Figura 54. Curva del porcentaje de inhibición del radical DPPH

## 8.4 Curvas de calibración para la determinación de actividad antioxidante (ABTS)

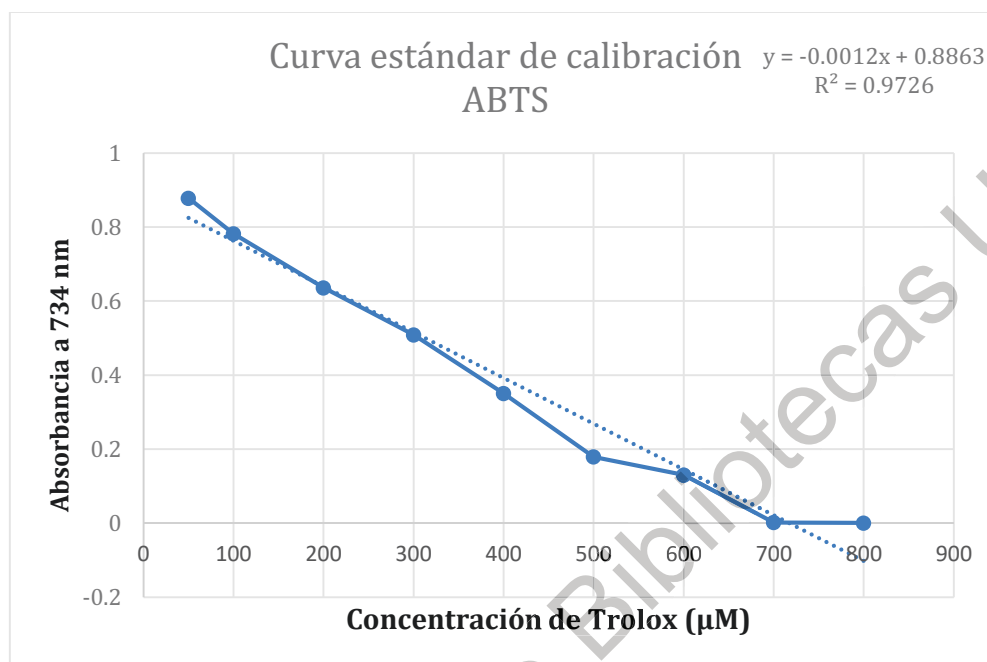


Figura 55. Curva estándar para cuantificación de actividad antioxidante ABTS

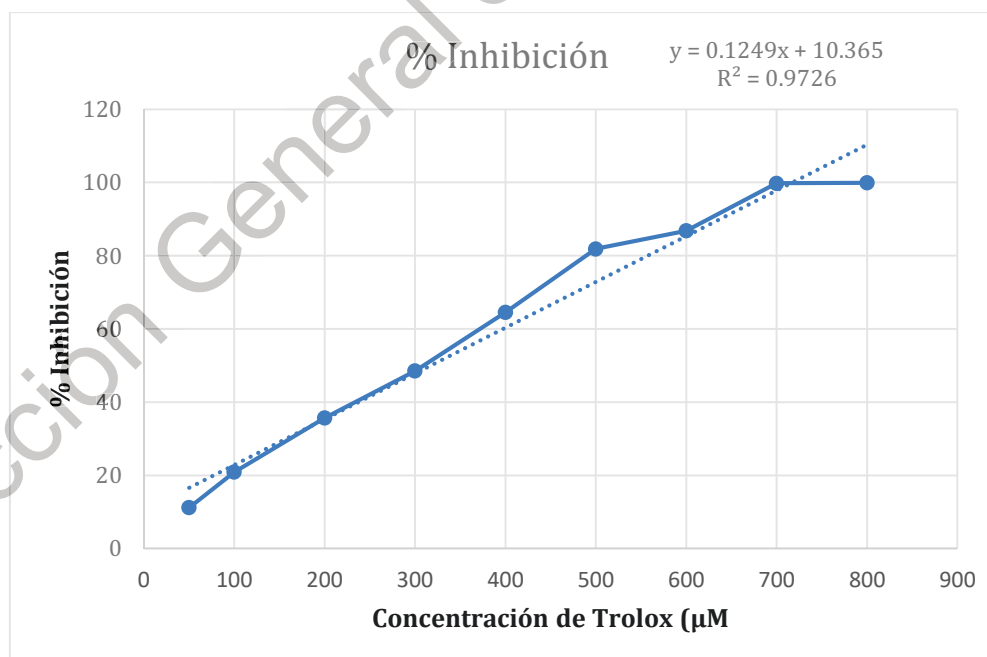


Figura 56. Curva estándar para cuantificación de actividad antioxidante ABTS

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez A, L. A. (Agosto de 2009). Tesis: Evaluación de avena, trigo y cebada para producción de forraje verde hidropónico. El Marqués, Qro, México.
- Alfthan, G., Aspila, P., Euroola, M., Ekholm, P. *et al.*, (2015). Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Helsinki, Finlandia.
- Amallesh S., Gouranga D., Sanjoy K. D. (2011). Roles of flavonoids in plants. *Journal of Pharmaceutical Science Technology*. 6
- Andreoni, V., Benedetti, A., Canzi, E., Ciappellano, S., & Fumagalli, M. (07 de Diciembre de 2005). *EP Patente n° 1602716A1*.
- Bai, B., Chen, W., & Zhang, J. (2018). Growth effects and distribution of selenite in *Medicago sativa*. *Plant and soil*, 425:527.
- Balam, F. (2007). *Uso de Biofertilizantes líquidos en la producción de plántula de jitomate (Lycopersicon esculentum)*. Tesis para obtener el grado de Especialista en Ingeniería en Inverdaderos, Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería.
- Bautista Bárcenas, E. (Junio de 2010). *Evaluación de dos fuentes de Se orgánico para desarrollar leche enriquecida en hatos de bovinos de doble propósito*.
- Bem, E.M. (1981). Determination of selenium in the environment and in biological material, *Environmental Health Perspectives*, 37, 183-200.
- Bittmal, S., Buckley, W. T., & Zaychuk, K. (2000). *US Patente n° 6058649A*.
- Boon P. (1996). Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animal Feed Science and Technology*. 59: 103-114
- Brummer, F. A., Pirelli, G. J., & Hall, J. A. (2014). *Selenium Supplementation Strategies for Livestock in Oregon*. Oregon State University, Oregon.

- Cheng Z., Moore J., Yu L. (2006). High-throughput relative DPPH radical assay. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 54, 7426-7436.
- Coppinger R.J, Diamond A.M. (2001). Selenium deficiency an human disease. In *Selenium: its Molecular Biology and Role in Human Health*, 219-233
- Coughtrey, P. J., Jackson, D., & Throne, M. C. (1983). *Radionuclide Distribution and Transport in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*. Rotterdam, Rotterdam, Neetherlands: A.A Balkema.
- Cupp, M., Combs, G., & Corradino, R. (7 de Julio de 1990). *Vitamin C can promote Selenium utilization*.
- Dharmasena A., (2014). Selenium supplementation in thyroid associated ophthalmopathy: an update, *International Journal of Ophthalmology*, 7, 365-375.
- El-Ramady H, Abdalla N, Taha HS, Alshaal T, El-Henawy A, Salah E-DF, ShamsMS, YoussefSM, ShalabyT, BayoumiY (2016) Selenium and nano-selenium in plant nutrition. *Environ Chem Lett* 14:123–147
- FAO (2001). *Manual Técnico Forraje Verde Hidropónico*. Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe. Santiago, Chile.
- Fishbein L., (1983) *Fundam. Appl. Toxicol.* 3:411
- Floegel A., Kim D., Chung S., Koo S., Chun O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.
- Food and Nutrition Board. (1980). *Recommended dietary allowances*. Committee on dietary allowances. Washington, DC: National Research Council, National Academy of Sciences, 162-1654.
- Frankenberger W.T & Benson S. (1994). *Selenium in the Environment*. Marcel Dekker, Inc. California.
- Fukumoto LR, Mazza G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*

- Gjoroska V.B., Kistik M., Klincarska I. J., Cvetanosvska A., Cvetanovska L., Gudeva L.K. (2018). Evaluation of total phenols in alfalfa (*Medicago sativa* L.) collected from different localities in Republic of Macedonia. *Journal of Agriculture and Plant Sciences*, 16.
- Grune T., Shringarpure R., Sitte N., Davies K. (2001). Age-Related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *Journal of Gerontology*. 56A, B459-B467.
- Guerrero B, Llugany M, Palacios O, Valiente M (2014) Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiol Biochem* 83:300–307
- Haferman, D. R. (1974). Effect of the dietary selenium on erythrocyte and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J. Nutr.*, 125:1438-1446.
- Hall J.A., Isaiah A., Estill C.T, Pirelli G.J., Suchodolsky J.S. (2017). Weaned beef calves fed selenium-biofortified alfalfa hay have an enriched nasal microbiota compared with healthy controls. *PLoS ONE*. 12(6): e0179215
- Harbone J.B., Baxter H., Moss G.P. (1999). *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants*. Segunda edición. Londres
- Hawrylak-Nowak B, Matraszek R, Pogorzelec M. (2015). The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiol Plant* 37:41
- Haygarth P. M. (1994) Global importance and globally cycling of selenium. *Selenium in the environment*. Marcel Dekker. Nueva York.
- Hefnawy, A. E., & Tórtora, J. (2010). The Importance of Selenium and the Effects of Its Deficiency in Animal Health. *Small Ruminant Research*, 89(2), 185-192.
- Hieftje, Gary *et al.*, (1982). Design and construction of a Low-Flow, Low-Power Torch for Inductively Coupled Plasma Spectrometry. *Applied Spectroscopy*.

Jensen E.S., Peoples M.B., Booddey R.M., Gresshoff P.M., Hauggaard-Nielsen H., Alves B.R., Morrison M.J. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. *A Review. Agron. Sustain. Dev.* 32, 329-364

Jiang C, Zu C, Shen J, Shao F, Li T (2015) Effects of selenium on the growth and photosynthetic characteristics of flue-cured tobacco (*Nicotiana Tabacum L.*). *Acta Soc Bot Pol* 84(1):71

Jones G. D., Droz B., Greve P., Gottschalk P., Poffet D., Seneviratne S., McGrath S.P., Winkel L. H. (2017). Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Environmental Sciences*. 114 (11).

Hawrylak-Nowak B, Matraszek R, Pogorzelec M (2015) The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiol Plant* 37:41

IUPAC (2019). Periodic Table of the Elements. [www.iupac.org](http://www.iupac.org).

Jiang C, Zu C, Shen J, Shao F, Li T (2015) Effects of selenium on the growth and photosynthetic characteristics of flue-cured tobacco (*Nicotiana Tabacum L.*). *Acta Soc Bot Pol* 84(1):71

Kaur S, Nayyar H (2015) Selenium fertilization to salt-stressed mungbean (*Vigna Radiata L.* Wilczek) plants reduces sodium uptake, improves reproductive function, pod set and seed yield. *Sci Hort* 197:304–317. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.048>

King, W., Michel, L., Wood, W. C., & Malt, R. A. (21 de Mayo de 1981). Reversal of selenium deficiency with oral selenium. *The New England Journal of Medicine*, 304(21), 1305. doi:10.1056/NEJM198105213042121

León-Martínez G., Osorio-Fortich M. R., Torrenegra M. E., Gil-González C. (2015). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus L.* *Revista cubana de Farmacia*. 49(4): 708-718.

- Lévesque M. (1974) Some aspects of selenium relationships in eastern Canadian soils and plants. *Canadian Journal Soil.* 54, 205-214.
- Li S., Bañuelos G.S., Wu L., Shi W., (2014), The changing selenium nutritional status of Chinese residents, *Nutrients*, 6, 1103-1114.
- Lin, Y.H., Shiau, S.Y. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed high copper, *Aquaculture* 207, 38-43.
- Liu Q., Wang D.J, Jiang X. J., Cao Z. H. (2004). Effects of the interactions between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Geochemistry and Health.* 26: 325-330
- MacIowiak, C. L., & Amacher, M. C. (2008). Soil Sulfur Amendments Suppress Selenium Uptake by Alfalfa and Western Wheatgrass. *Journal of Environmental Quality*, 772-779.
- Martínez, M. V. (1992). Determinación de Se en suero por espectrofotometría de absorción atómica. *Universidad Complutense de Madrid.*
- Mattioli S., Dal Bosco A., Machado-Duarte J. M., D'Amato R., Castellini C., Beone G. M., Fontanella M. C., Beghelli D., Regni L. (2019). Use of selenium-enriched olive leaves in the feed of growing rabbits: Effect on oxidative status, mineral profile and Selenium speciation of *Lingissimus dorsi* meat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 98-105
- Meyer J.H., Lofgreen N.R., Ittner N.R. (1956). Further Studies on the Utilization of Alfalfa by Beef Steers. *Journal of Animal Science.* 15. 64-75.
- Mikkelsen, R.L., Page, A.L., Bingham, F. T. (1989). Factors affecting selenium accumulation by agricultural crops. *Selenium in Agriculture and the Environment.* Madison, WI: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, pp. 65-94
- Minson. (1990). Forage in Ruminant Nutrition. *Academic Press*, 369-3981.

Navarro-Alarcón M., Cabrera-Vique C. (2008) Selenium in food and human body: A review. *Science Total Environment*. 400 115-140.

Nawaz F, Ahmad R, Ashraf M, Waraich E, Khan SZ (2015) Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:191–200. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.003>

Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS (\*+) assay. *J Agric Food Chem*

Neve, J., & Favier, A. (1998). Selenium in Medicine and Biology. *International Congress on trace elements in Medicine an Biology*. Avoriaz: New York Walter de Gruyer.

Newland, L. W. (1982). *Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag, New York, pp. 45-47

Norma UNE-EN ISO 11885. (1996). Determinación de 33 elementos por espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

Oldfield, J.E. (2002) *Selenium World Atlas: Updated Edition*; Selenium-Tellurium De. Assoc.: Grimbergen, Bélgica.

Oomah, B. A.-M.-P. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 935-942.

Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutrition Science*. (5) 1-15

Plant, J.A, Bone, J., Voulvoulis, N., Kinniburgh, D.G *et al.*, (2014). *In Treatise on Geochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed.; Turekian, K.H. United Kingdom, 13-57.



- Presser, T.S., Sylvester, M.A.; Low, W.H. (1994) Bioaccumulation of selenium from natural geologic sources in western states and its potential consequences. *Environmental Management*. 18,423
- Ramírez Bribiesca, E., Hernández Camacho, E., Hernández Calva, L. M., & Tórtora Pérez, J. L. (2004). Effect of Parenteral Supplement with Sodium Selenite on Lamb Mortality and Hematic Values of Selenium. *Agrociencia*, 43-51.
- Rayman, M. P. (15 de Julio de 2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 233-241.
- Rayman, M.P. (2008). Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 100, 254-268.
- Ropstad, E., Østerås, O., Øvernes, G., & Frosli, A. (1988) *Acta Vet.* 29(2): 159.
- Rotruck, J. P. (1973). Selenium: biochemical role as component of glutathione peroxidase. *Science*, 588-590.
- Schwartz, K., & Foltz, C. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 3292-3293.
- Schwartz, K., Porter, L. A., & Fredga, A. (Abril de 1972). Some regularities in the structure-function relationship of organoselenium compounds effective against dietary liver necrosis. *New York Academy of Sciences*, 192, 200-2014, doi:10.1111/j.1749-6632.1972.tb52591.x
- Seijas Martínez-Echeverría, M. V. (1992). *Determinación de Se en Suero Por Espectrofotometría de Absorción Atómica*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Química Inorgánica y Bioinorgánica, Madrid.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.

- Sors T.G., Ellis D., Salt D. (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Plant Journal* 42(6): 785-797
- Smith, A., Picciano, M., & Milner, J. (1982). Selenium intakes and status of human milk and formula fed infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 521-526.
- Takashi A. & Ohnishi T. (2004). The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the international space station. *Biological Science Space*. 18, 255-260.
- Terry, N., & Zayed, A. M. (1994). Selenium Volatilization by Plants. En *Selenium in the Environment* (págs. 343-367). New York: Frankenberger.
- Tórtola, J. L., López, R., & Revilla, A. (Septiembre de 2012). La deficiencia de Se. (CONACYT, Ed.) *Ciencia y desarrollo*.
- Un Xinxin, F. Y. (29 de Enero de 2008). *CN Patente n° 101225006A*.
- Underwood, E. J., & Suttle, N. F. (2004). The mineral nutrition of livestock. Cambridge, United Kingdom: CABI Publishing.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA), (2016). Title 21. Food and drugs: Food additive permitted in feed and drinking water of animals. Section 21CFR573.920. Selenium.  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=573.920> (Consultado el 30 de Agosto, 2018)
- Varadachari, C. (20 de Marzo de 2009). *US Patente n° 20100240533A1*. Recuperado el 19 de 09 de 2017, de <https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=WO2010089776&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PC>  
[T+Biblio](#)
- Varo P., Alfthan G., Ekholm P., Aro A., Koivistoinen P. (1988). Selenium intake and serum selenium in Finland: effects of soil fertilization with selenium. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 48 324-329.

Wang R.L., Liu S.W., Xin X. W., Chen S., Peng Y.J., Su Y.J., Song Z. K. (2017) Phenolic acids contents and allelopathic potential of 10-cultivars of alfalfa and their bioactivity. *Allelopathy Journal*. 40 (1): 67-70

Wilhem Thomé. (1985) Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz.

Williams, C. J. (1995). Flavonoid profiles in leaves, flowers and stems of forty-nine members of the phaseolinae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 655-667.

Winkel, L., Vriens, B., Jones, G.D., Schneider, S. *et al* (2015). Selenium Cycling Across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review. *Nutrients*. 7(6): 4199-4239.

Woch W. & Hawrylak-Nowak B. (2019). Selected antioxidant properties of alfalfa, radish, and white mustard sprouts biofortified with selenium. *Polish Botanical Society*. Lublin.

Won-Yeong S., Sung-Sik C., Jeong-Hwa C. (2018). Antioxidant activities of selenium-treated *Spinaca oleracea* L. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 6: 510-515.

Xiān, L. (2012). CN Patente n° 102795938A.

Ying, L. F. (2013). CN Patente n° 1017811144B.

Young, D. C. (4 de Abril de 1986). US Patente n° 4847087A.

Zhūwéixiān, D. (1993). CN Patente n° 1088725A.