Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

Capítulos temáticos de Biología, Química y Agronomía.

Ciencia e innovación para la salud.

José Luis Zavala Aguirre
Juan Villafaña Rojas
Froylán Mario Espinoza Escalante
Editores

Editorial Universidad Autónoma de Guadalajara

Universidad Autónoma de Guadalajara

La información compendiada en este libro digital proviene de los trabajos presentados durante el 6to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía de la Universidad Autónoma de Guadalajara el cual fue celebrado del 27 al 29 de septiembre de 2017 en las instalaciones de UNICO de la misma Universidad. La información fue presentada por investigadores y grupos de trabajo especializados sobre quienes recae la responsabilidad de la validez de dichas investigaciones. Los autores, comité editorial y la casa editorial no somos responsables de las consecuencias del uso que se dé a la información presentada. La mención de productos comerciales o servicios, de ninguna manera implican compromisos o afiliaciones por parte de la Universidad Autónoma de Guadalajara. Se autoriza el uso y distribución de los contenidos, libremente proporcionados por los autores para su compilación y registro ante ISBN, para lo cual se requiere sean citados dando créditos a sus creadores. Cualquier duda o aclaración deberán ser realizadas directamente con los autores correspondientes cuyos datos de contacto están registrados en cada contribución. El comité editorial intentó unificar los formatos en base a las retroalimentaciones recibidas durante el proceso de galeras; los datos incompletos o faltas ortográficas son responsabilidad de los autores que no dieron retroalimentación.

ISBN: 978-607-719-008-0

EDITORIAL: Universidad Autónoma de Guadalajara, A.C. Av. Patria 1201. Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco, 45129. México. Primera edición: 2017

Comité Científico:

Agrobiotecnología:

M.C. Mariana Dolores Medina Lerena
M.C Jaime Alcalá Gómez

Alimentos:

Dr. Froylán Mario Espinoza Escalante

Biología:

Dr. José Aquileo Lomelí Sención
Dr. José Luis Zavala Aguirre

Biotecnología:

Dr. Juan Villafaña Rojas
Dr. Miguel J. Beltrán García

Ingeniería Química:

Dr. Efrén Aguilar Garnica

Química Farmacobiológica:

Dr. Froylán Mario Espinoza Escalante

PRÓLOGO xxvii

AGROBIOTECNOLOGÍA

[1]Barrera-Galván, T., [1]Rodríguez-Mendoza, R., [1]Bañuelos-Amezcua, U. y [1,2*]Oceguera-Contreras, E. PRUEBA DE CONCEPTO DE UN POLINIZADOR AUTOMÁTICO DE LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) EN INVERNADERO. 1

[1]Ibarra-Rivera, G., [1]Quiñones-Aguilar, E., [1,2] Enríquez-Vara, J., [1]García-Márquez, E., [1,2]Guízar-González, C., y [1*]Rincón-Enríquez, G. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EN LA MULTIPLICACIÓN DEL BACTERIÓFAGO LÍTICO ΦXaF18 ASOCIADO A LA CEPA BV801 DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*..... 2

[*]Sainz-Moreno, M.E., Arcos-Ramos, R., y Reyes-Cardozo, J. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS EN LA TEMPORADA DE ESTIAJE-LLUVIAS DE LA LAGUNA DE COYUCA DE BENÍTEZ, ESTADO DE GUERRERO, MÉXICO. 7

[1]Ceja-Gálvez, C.A., [1]Avalos-Alcántara, Y., [2]Angoa-Perez, M.V., [2]Mena-Violante, H.G., [2]Oregel-Zamudio, E., y [2*]Oyoque-Salcedo, G. CONTROL DE CENICILLA EN FRÍJOL CON EXTRACTO DE NEEM Y AGROHOMEOPATÍA DEL MISMO HONGO. 15

Rodríguez-González, N. C., Fernández-Rivera, E. y *Oyoque-Salcedo, G. EVALUACIÓN DE SUELOS AGRÍCOLAS DE LA REGIÓN DE JIQUILPAN Y SAHUAYO MICHOACÁN..... 20

[1]Santos-Orozco, D.L., [1]Ramos-Ibarra, M.L., [2]Parra-Cervantes, F.J., [3]Torres-Bugarín, O., Cervantes-de-Parra, E., [4]Real-Navarro, M., [5]Torres-Rodríguez, A. EVALUACIÓN GENOTÓXICA POR LA CONTAMINACIÓN DEL RÍO SANTIAGO EN JUANACATLÁN vs ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO EN UN MODELO DE GATOS. 21

Flores-Garnica, J. G. y *Hurtado-Casillas, M. ANÁLISIS DEL INCREMENTO DE LA OCURRENCIA DE INCENDIOS FORESTALES EN RELACIÓN AL AUMENTO DE LA SUPERFICIE AGRÍCOLA. 24

[2]Vergara-Rivera, E., [1]*Amaro-Estrada, I., [1]Preciado-de-la-Torre, J.F., [1]Cobaxin-Cárdenas, M.E.., y [1]Rodríguez-Camarillo, S.D. BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS RECONOCIDOS POR MOLÉCULAS SÉRICAS SANGUÍNEAS DE UN BOVINO INMUNOPROTEGIDO CONTRA *Anaplasma marginale*. 25

*Quiñones-Islas, N. S., Jacobo-Salcedo, M., Muñoz-Villalobos, J. A., y García-Mariscal, K. USO DEL ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO CON APLICACIÓN POTENCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO, CARBONO Y PH EN COMPOSTAS DE ESTIÉRCOL. 27

[2]Castillo-Martínez, K.B., [1*]Amaro-Estrada, I., [1]Martínez-Salgado, J., [1]Quiroz-Castañeda, R.E., [2]Pineda-Gutiérrez, J., [1]Rodriguez-Camarillo, S.D. EXPRESIÓN RECOMBINANTE Y PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA CONSERVADA DE LA RICKETTSIA *Anaplasma marginale*. 28

*Quiñones-Islas, N. S., García-Mariscal, K., Lazcano-Escobar, J. F. y Martínez-Ramírez, N. CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE RENDIMIENTOS EN EL CONTENIDO DE ACEITE Y PROTEÍNA EN MATERIALES DE PIÑÓN TROPICAL ESTABLECIDOS EN EL ESTADO DE COLIMA, MÉXICO. 30

*Melo-Quintana, G., y Agudelo-López, E. DINÁMICA SUCESIONAL DE LA VEGETACIÓN ANDINA DE LOS SECTORES CHAPINERO Y LAURELES DEL EMBALSE NEUSA (COLOMBIA). 31

[*1]Fierro-Álvarez, A., [1]González-López, M., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A. VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE ACEITES ESENCIALES EN *Lavandula dentata L. var. candicans* BATT. 33

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A. EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE *Lavandula angustifolia* MILL. EN LA CD. DE MÉXICO. 34

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A. PROPAGACIÓN DE DOS ESPECIES DE FLORIPONDIO (*Brugmansia sp*.) EN LA CD. DE MÉXICO. 35

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A. PROPAGACIÓN DE GERANIO DE OLOR (*Pelargonium graveolens L. Var. Vera*) EN LA CD. DE MÉXICO. 36

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A. PROPAGACIÓN DE MASTRANZO (*Mentha x rotundifolia* (L.) HUDS) EN LA CD. MEXICO. 37

*Assad-Alvarez, A. y Flores-Garnica, J.G. ANÁLISIS MULTIVARIADO EN ECUACIONES ALOMÉTRICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO SECO EN COMBUSTIBLES FORESTALES VIVOS. 38

[*1]Martínez-López, V., [2]Juarez-Arellano, E.A. y [3]Navarro-Martínez, A.K. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS SUSTRATOS ORGÁNICOS, *Beta vulgaris ssp. Vulgaris* Y *Manihot esculenta*, MODIFICADOS POR MOLIENDA MECÁNICA. 39

*Hernández-Navarro, A., Sánchez-Ríos, J.L., Jiménez-Castañeda, V., Robles-Pinto, G. y Sánchez-Martínez, M.C. BIOCONTROL DE TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) EN LA PAPA (*Solanum tuberosum*), CON EL HONGO *Trichoderma sp*. 41

[1]Jaimes-Martínez, C.A., [2*]Quiroz-Castañeda, R.E., [2]Martínez-Ocampo, F., [1]Preciado de la Torre, J.F. y [1]Amaro-Estrada, I. DETECCIÓN MOLECULAR DEL HEMOPLASMA *Candidatus Mycoplasma haemobos* EN GANADO BOVINO MEXICANO. 42

*Mora-Maldonado, L.E., Padilla-Rizo, B., Maldonado-Santoyo, M. y Zitzumbo-Guzmán, R. ESTUDIO DE VALORIZACIÓN DEL PELO DE DESECHO DE CURTIDURÍA PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN ALIMENTACIÓN AVÍCOLA. 44

[2]Millán-Hernández, A.D., [2,1*]Quiroz-Castañeda, R.E., [3]Martínez-Ocampo, F., [1]Cobaxin-Cárdenas, M. y [1]Rodríguez-Camarillo, S. CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA Y EXPRESIÓN MOLECULAR DE UNA HEMOLISINA DE *Anaplasma marginale*. 45

[1*]Borbón-Gracia, A., [2]Macías-Cervantes, J., [3]Armenta-Osuna, P. y [4]Villaseñor-Mir, H.E. EVALUACIÓN DE VARIEDADES DE TRIGO CRISTALINO Y HARINERO EN EL NORTE DE SINALOA. 47

[1*]Peinado-Fuentes, L.A., [2]Cubedo-Ruíz, E.A., [1]Llaven-Valencia, G., y [3]Preciado-Ortiz, R.E. PROBADORES DE LÍNEAS DOBLE HAPLOIDES DE MAÍZ AMARILLO CON ALTO CONTENIDO DE ACEITE EN EL NORTE DE SINALOA. 50

[1*]Chan-Cupul, W., [1]Marín-Cortez, F., [1]Manzo-Sánchez, G., [1]Hernández-Ortega, H.A., [1]Buenrostro-Nava, M.T. y [2]Galindo-Velasco, E. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ROYA EN FRAMBUESA (RUBUS IDAEUS L.) ORGÁNICA BAJO APLICACIONES DE *Trichoderma spp*. 60

[1*]Moreno-Zacarías, P.E., [2]Ruiz-Ruiz, G., y [2]Arroyo-Figueroa, G. RESPUESTA A DOS FUENTES DE FERTILIZACIÓN EN NOPAL (*Opuntia ficus-indica*, VAR. ATLIXCO) EN SALVATIERRA, GUANAJUATO. (REACTION OF NOPAL (*Opuntia ficus-indica*, VAR. ATLIXCO) TO TWO SOURCES OF FERTILIZATION AT SALVATIERRA, GUANAJUATO). 61

*Vázquez-Lares, E. y Piceno-Hernández, R. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) CON APLICACIÓN DE ESTIÉRCOL DE ANIMALES DE GRANJA EN TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. 71

[1]Labrador-Castorena, M.F., [1*]Velázquez-Juárez, G., [2]Rojas-López, C.A., [2]Padilla-Salas, V.R. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN ABEJAS (*Apis mellifera*) DE LA REGIÓN CENTRO DE JALISCO. 72

*Cerón-Zamora, C., Añorve-Morga, J., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A. y Gonzalez-Olivares, L.G. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN GALLINAS PONEDORAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO MEDIANTE ENCAPSULADOS DE ALGINATO E INGESTA ORAL DIRECTA. 81

*Cerón-Zamora, C., Añorve-Morga, J., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A. y Gonzalez-Olivares, L.G. OBTENCIÓN DE HUEVOS DE GALLINAS PONEDORAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO A TRAVÉS DE ENCAPSULADOS E INGESTA ORAL DIRECTA 83

[1*]Valenzuela-Herrera, V., [1]Ramírez-Soto, M., [2]Padilla-Valenzuela, I., [1]López-Guzmán, J.A., [1]Pérez-Márquez, J., [3]Ortega-Murrieta, P., y [3]Fierros-Leyva, G.A. ESTABILIDAD DE RENDIMIENTO EN GENOTIPOS DE GARBANZO EN LOCALIDADES DEL ESTADO DE SINALOA MEXICO. 84

[1]*López-Guzmán, J.A., [1]Valenzuela-Herrera, V., [2]Ortega-Murrieta, P.F., [2]Fierros-Leyva, G.A., [1]Ramírez-Soto, M. COMBO-743 LÍNEA AVANZADA DE GARBANZO BLANCO PROPUESTA PARA SU LIBERACIÓN EVALUADA EN CINCO CICLOS DE CULTIVO EN EL CENTRO DE SINALOA. 87

[1]Avilés-Cabral, H., [1]Ramírez-Montes, S., [1]Jaimez-Ordaz, J., [2]Cruz-Guerrero, A.E., [3]Cruz-Cansino, N.S., [2]Fernández-Perrino, F.J., [1*]Castañeda-Ovando. A. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON ACTIVIDAD MICOTOXIGÉNICA EN ALIMENTO PARA GANADO PROVENIENTE DEL VALLE DE TULANCINGO, HGO. 90

Téllez-Valerio, C.E., Martínez-Núñez, M., Ruiz-Rivas, M., Luna-Suárez, S. y *Rosas-Cárdenas, F. CONSTRUCCIONES PARA LA SOBREEXPRESIÓN DE miRNAs PREFERENTES EN SOLANÁCEAS. 98

Martínez-Núñez, M., Vázquez-Portillo, R.E., López-Maldonado, S., Téllez-Valerio, C.E., Vera-Hernández, P.F., Ruiz-Rivas, M., Luna-Suárez, S. y *Rosas-Cárdenas, F. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRIMEROS miRNAs DE AMARANTO Y SU POSIBLE FUNCIÓN EN EL DESARROLLO. 99

*Díaz-Serrano, C.I.G. y Brena-Becerril, A. HOMOLOGÍA Y PRESENCIA DE BETANIDINA GLUCOSILTRANSFERASA Y CHALCONA SINTASA EN PLANTAS POR MEDIO DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. 100

[1]Barragán-Álvarez, C.P., [1]Marino-Marmolejo, E.N., [1]Gutiérrez-Ortega, A., [1]Padilla-Camberos, E., [2]Barajas-López, C., [2]Espinosa-Luna, R., y [1*]Martínez-Velázquez, M. ANÁLISIS FUNCIONAL PRELIMINAR DE UN CANAL DE CLORO MODULADO POR LIGANDO, EN LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* 102

*Mex-Álvarez, R.M., Garma-Quen, P.M., Bolívar-Fernández, N., Guillén-Morales, M.M. y Pantoja-Bolio, F.M. VARIACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE MAÍCES DE HOPELCHÉN, CAMPECHE (MÉXICO). 116

Guzmán-Vargas, B., Tejeda-Lozano, R., Neri-Muñoz, Ma. Y. y *Hinojoza-Loza, E. SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA Y CONTROL INTEGRAL DE GARRAPATA *Boophilus spp.* EN EL MUNICIPIO DE TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA. 117

*Ceja-Torres, L.F., Torres-Magaña, S.K., y López-Díaz, S. EVALUACIÓN DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN BLANCA DE LA CEBOLLA. 118

Bustamante-Espinosa, L.V., Montes-García, P., Vazquez-Feijoo, J.A., Callejas-Hernández, J., Nava-Licona, M.A., y Ortiz-Balderas, M. MEJORAMIENTO DE LA RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN AXIAL DE UNA MATRIZ GRANULAR DE DIATOMITA PARA ALOJAR NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS MEDIANTE LA ADICIÓN DE CAL. 123

[1]Aguilera-Arana M.A., [1]Pérez-Espino A.M., [2]Solorio-Alvarado C.R., y [1*]Ortiz-Alvarado, R. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPIDICA DE ESPECIES COMERCIALES Y NATIVAS DE LA FAMILIA TAXONOMICA DE LAS *Rosaceas*, EN MÉXICO. 124

[1]Rodríguez-Salinas, P.A., [1]Zavala-García, F., [2]Urías-Orona, V., [3]Muy-Rangel, D., [3]Basilio-Heredia, J., [1]Rodríguez-Romero, B.A. y [1*]Niño-Medina, G. EVALUACIÓN DE COLOR Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN MAÍCES (*Zea mays* L.) PIGMENTADOS AUTÓCTONOS DEL SUR DE NUEVO LEÓN. 131

*Polanco-Florián, L.G., Pérez-González, O. y Alvarado-Gómez, O.G. LOS ACTINOMICETOS: UNA ALTERNATIVA PARA EL MANEJO SUSTENTABLE DE HONGOS PATÓGENOS DE LOS CÍTRICOS (*Citrus sp*.). [1*]Sánchez-Sánchez, E., [1]Armenta-Castro, C.M., [1]Armenta-Cejudo, R.A. FENOLOGIA Y PRODUCCIÓN DE 4 HÍBRIDOS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*) EN TEMPORAL DEFICIENTE. 132

[1*]Sánchez-Sánchez, E., [1]Armenta-Castro, C.M., [1]Armenta-Cejudo, R.A. FENOLOGIA Y PRODUCCIÓN DE 4 HÍBRIDOS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*) EN TEMPORAL DEFICIENTE. 133

[1*]Sánchez-Sánchez, E., [1]Armenta-Castro, C.M., [1]Armenta-Cejudo, R.A. COMPORTAMIENTO DE LA HIGUERILLA (*Ricinus communis*) A DIFERENTES DENSIDADES DE POBLACIÓN EN TEMPORAL. 134

[1*]Ramírez-Godina F., [2]Robledo-Torres, V., [1]Torres-Tapia, M.A., [1]García-Osuna, H.T. COMPONENTES DE RENDIMIENTO Y CALIDAD DE FRUTO DE HÍBRIDOS DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot.). 135

[1*]Robledo-Torres, V., [2]García-León, Á., [3]Ramírez-Godina, F., [1]Mendoza-Villarreal R., y [1]Camposeco-Montejo, N. EL USO DE PORTAINJERTOS EN LA PRODUCCIÓN DE PIMIENTO EN INVERNADEROS DE MEDIANA TECNOLOGÍA. 141

[1]*Lucas-Bautista, J.A., [1]Mena-Violante, H.G., [1]Ramírez-Jiménez, M.R., [1]Oregel-Zamudio, E., [1]Angoa-Pérez, M.V., [1]Oyoque-Salcedo G., [2]Molina-Torres, J. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS DE FRESA CONTRA BACTERIAS FITOPATÓGENAS. 147

Diaz-Medina, L.K., *Estrada-Flores, J.G., Arriaga-Jordán, C.M. y Brunett-Pérez, L. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD NUTRITIVA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES ARVENSES INCLUIDAS COMO ADITIVO EN LA ALIMENTACIÓN DE OVINOS. 155

[1]Lee-Ramírez, B., [2]Martínez-Rodríguez, A., [2]Valdés-Salas, B., [2]Valdés-Salas, E., y [1]Beltrán-García, M. USO DE LA MICROPROPAGACIÓN VEGETAL COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA MICROBIANA ENDÓFITA Y SUS APLICACIONES EN LAS PLANTAS. 157

Vargas-Zaragoza, C., González-Chávez, R., Beltrán-García, M.J. ALTERACIÓN DE GENES DE LA PARED CELULAR EN RAÍCES DE MAÍZ (*Zea mays*) INDUCIDA POR BACTERIAS ENDÓFITAS: ANÁLISIS POR Q-PCR. 159

[1*]Martínez-Rodríguez, A., [1]Macedo-Raygoza, G., [2]Lee-Ramirez, B., [2]Guzmán, D., [1]Valdez-Salas, B. DINÁMICA DE SUCESIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS TRANSMITIDAS POR LA SEMILLA Y LA MICROPROPAGACIÓN DE *Agave marmorata* PARA FINES DE RESTAURACIÓN. 160

Pérez-Domínguez, J.F., Villareal-Rodas, J.H., Arias-Chávez, L.E, Díaz-Mederos, P., & Ireta-Moreno, J. RESULTADOS DE PARCELAS DE VALIDACION CON SORGO DULCE “SUPERSORGO” EN JALISCO. 161

Pérez-Domínguez, J.F., Villareal-Rodas, J.H., y Flores-López, H.E. EFECTO DEL DAÑO CAUSADO POR GUSANO COGOLLERO (*Spodoptera frugiperda Smith*) EN LA INCIDENCIA DE PUDRICIÓN DE TALLO (*Fusarium subglutinans*) Y RENDIMIENTO DE GRANO EN HIBRIDOS DE MAIZ EN LA REGIÓN CIÉNEGA-BAJÍO MICHOACANO. 162

[1]López-de-Nava, T., [1]Rodríguez-Mendoza, R., [1]Bañuelos-Amezcua, U. y [1,2*]Oceguera-Contreras, E. BACTERIAS ENDÓFITAS DE MAÍZ BLANCO (*Zea mays* L.) COMO BIOINOCULANTES EN GERMINACIÓN DE SEMILLA. 163

*Beltrán-García, M.J., Macedo-Raygoza, G.R., Fonseca-Sepúlveda, C.U., Lew-Sánchez, B., y Martínez-Rodríguez, A. USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL DISEÑO DE SIMBIOSIS Y LA FITOPATOLOGÍA DE CULTIVOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA. 164

[1]Macedo-Raygoza, G.M., [1]Valdez-Salas, B., [2]Cisneros-Reyes, C.I., y [2]Beltrán-García, M.J. EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE AU Y AG EN RAÍCES DE BANANO Y SU PAPEL EN LA COLONIZACIÓN DE ENTEROBACTER CLOACAE ENDÓFITO DE BANANO. 165

[*]Fuentes-Medina, E., Guzmán-Rodriguez, O.D., Cruz-Adame, J.A. y Arroyo-Moreno, D.A. IDENTIFICACIÓN POR MALDI-TOF DE *Streptomyces avidinii* AISLADO DE SUELOS DEL TUITO CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA. 167

[1]Macedo-Raygoza, G.M., [1]Valdez-Salas, B., [2]Cisneros-Reyes, C.I., y [2]Beltrán-García, M.J. ENTEROBACTER CLOACAE Y KLEBSIELLA VARIICOLA ENDÓFITOS ANTAGONISTAS DE *Mycosphaerella fijiensis* Y BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO. 168

Guzmán-Claustro, T.M., Lew-Sánchez, B., Macedo-Raygoza, G.M., Beltrán-García, M.J. BACILLUS CEREUS, BACILLUS SUBTILIS Y OCHROBACTRUM GALLINIFAENCIS. ENDÓFITOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE EMBRIONES DE MAÍZ: ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN DEL SUSTRATO. 169

Zaizar-Castañeda, I.A., Gutierrez-Santa, A.A, Flores-Delgadillo, O., Guzmán-Rodriguez, D., Macedo-Raygoza, G.M., Peralta-Mendoza, J., Huerta-Robles, A.X., y Beltrán-García, M.J. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF, SECUENCIACIÓN DE ARNR 16S Y PRUEBAS AGRONÓMICAS DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE SEMILLA DEL *Agave tequilana*. 170

[1]Lew-Sánchez, B.E.,[1]Echaide-Aquino, F., [2]Huerta-Robles, A.X., y [1]Beltrán-Garcia, M.J. BACTERIAS ENDÓFITAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ COMO UN INSUMO BIOLÓGICO PARA MEJORAR EL USO EFICIENTE DE NUTRIENTES Y COMPRENDER LAS RELACIONES CON LA PLANTA BAJO UN ACERCAMIENTO DE PCR TIEMPO REAL. 171

Villaseñor-Sánchez, A.S., Flores-Delgadillo, O.J., Martínez-Rodríguez, A., Beltrán-García, M.J. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE *Agave angustifolia*. 172

ALIMENTOS

[1]*López-Martínez, L.A., [2]Guerrero-Nájera, Z.A., [1]Martínez-Juárez, L.G., [2]Álvarez-Salas, C., [2]Perez-Martínez, J.D., [3]López-Pablos, A.L., y [3]Saavedra-Leos, M.Z. DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE p-ANISIDINA EN ORGANOGELES. 173

*[1]Pinedo-Serrano, E., [1]Contreras-Ovalle, N.I., [1]Torres-García, B.E., [2]Guzmán-Maldonado, S.H. COMPOSICIÓN FENÓLICA, CONTENIDO DE VITAMINA C Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE *Condalia ericoides*. 177

[*1]Vázquez-Luna, A., [2]Palmeros, E.C., [3]Flores-Vela, S.P., [2]Díaz-Vázquez, A.E., [1]Díaz-Sobac, R. CONTRIBUCIÓN NUTRIMENTAL DE LA CERVEZA MEDIANTE UN CONSUMO MODERADO

NUTRIMENTAL CONTRIBUTION OF BEER THROUGH MODERATE CONSUMPTION..... 184

[2]Andrés-Meza, P., [1]Rodríguez-Montalvo, F.A., [2]Leyva-Ovalle, O.R., [1]Sierra-Macías, M., [3]Espinosa-Calderón, A., [4]Vázquez-Carrillo, M., [5]Tadeo-Robledo, M., [6]Gómez-Montiel, N.O., [7]López-Romero, G., [2]Cebada-Merino. EFECTO DE LA DENSIDAD DE PLANTA Y DOSIS DE FERTILIZACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE ELOTE EN NUEVOS HÍBRIDOS EXPERIMENTALES DE MAÍZ. 191

[1*]Villa-Cisneros, C.A., [1]Luna-Díaz, J.J., [1]Ramírez-Anguiano, A.C., y [1]Velasco-Ramírez, S.F. DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO GENERAL DE ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN EL DESECHO DEL GUSANO DE HARINA (*Tenebrio molitor*). 193

[1]Osorno J.J., [1]Castorena J.H., [2]Robles dlT. R.R., [2]*Robles L.M.R. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CAMPO ELECTRICO SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE ALBUMINA DE HUEVO. 199

Vera-Soto, A., Ramírez-Godínez, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Añorve-Morga, J. y *González-Olivares, L.G. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE UNA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA ADICIONADA CON EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*). 209

[1]Sampayo-Hernández, M.A., [1*]Torres-Tapia, M.A., [1]Vázquez-Badillo, M.E., y [2]Zamora-Villa, V.M. DETERIORO DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) ALMACENADO A TEMPERATURAS Y HUMEDADES ALTAS. 211

[1]Morales-Toledo, L.I., [2]Navarro-Mtz, A.K. y [3]Juarez-Arellano, E.A. OBTENCIÓN DE AZÚCARES SIMPLES A PARTIR DE MALANGA (*Colocasia esculenta*) Y RAQUIS DE PLÁTANO MACHO (*Musa balbisiana*) POR MOLIENDA MECÁNICA. 217

Ramírez-Frausto, C., Roque-Betanzos, H.E., Escalante-García, Z.Y., Prado-Ramírez, R., y [1*]García-Parra, M.D. CONSERVACIÓN DE SUERO DULCE BOVINO DE LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO, MEDIANTE MICROFILTRACIÓN Y TECNOLOGÍA DE BARRERAS. 219

*Reyes-Cardoso, J., Arcos-Ramos, R. y Enrique-Sainz, M. EVALUACION DE LA CALIDAD DEL AGUA EN EL SISTEMA ACUATICO; LAGUNA ZUMPANGO DE OCAMPO, EN EL ESTADO DE MÉXICO..... 225

[1]Díaz-Sobac, R., [2]Méndez-Hernández, M., [2]Peralta-Fuentes, M.I., [3]Díaz-Vázquez, A.E., y *[1]Vázquez-Luna, A. ELABORACIÓN DE UNA TABLETA DE CHOCOLATE SABOR A CAFÉ PARA PERSONAS DIABÉTICAS. 227

*López-López, M.E., López-Valenzuela, J.A., Delgado-Vargas, F., López-Angulo, G., Carrillo-López, A., Ayón-Reyna, L. E. y Vega-García, M.O. EFFECT OF HOT WATER TREATMENT COMBINED WITH CALCIUM LACTATE ON CHILLING INJURY TOLERANCE IN MANGO CV. KEITT. 232

Chairez-Vega, D.A., Lopez-Valenzuela, J.A., Vega-García, M.O., López-López, M.E., Chávez-Ontiveros, J., Pineda-Hidalgo, K.V. y *Salazar-Salas, N.Y. IDENTIFICATION OF PROTEINS ASSOCIATED WITH CHILLING INJURY TOLERANCE INDUCED BY HOT WATER TREATMENT IN MANGO FRUIT. 234

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J.A. y [1,2]Vega-García, M.O. APPLICATION OF HOT WATER IMMERSION AND CALCIUM TO INHIBIT CHILLING INJURY IN MANGO. EFFECT ON POSTHARVEST QUALITY AND ACTIVITY OF CELL WALL DEGRADING ENZYMES. 236

Landeros-Sánchez, A., Salazar-Salas, N.Y., López-Angulo, G., Pineda-Hidalgo, K.V., Chávez-Ontiveros, J., Delgado-Vargas, F. y *Lopez-Valenzuela, J.A. IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS ASSOCIATED WITH CHILLING INJURY TOLERANCE IN TOMATO FRUIT WITH HOT WATER PRETREATMENT. 238

Ruiz-Ruiz, D., Kirchmayr, M.R., Rincón-Enríquez, G., Quiñones-Aguilar, E.E., Prado-Ramírez, R., [*]García-Parra, M.D. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DETERIORADORAS DE LACTO SUERO DULCE LÍQUIDO BOVINO, DEL ESTADO DE JALISCO, POR MEDIO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF. 240

[1]Avila-Lizarraga, Y.G., [1]Sánchez-Contreras, A., [2]González-Avila, M., y [1]*González-Flores, T. EXTRACCIÓN ACUOSA DE FIBRA SOLUBLE A PARTIR DE LA BIOMASA DE UN SUBPRODUCTO AGROINDUSTRIAL DE *Agave fourcroydes*. 247

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J A. y [1,2]Vega-García, M.O. [1]Hernández-Mota, C.M.E., y. [2]Ramírez-Hernández, A. MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL ALMIDÓN DE PLÁTANO MACHO (*Musa paradisiaca* L.) CON POLIETILENO MONOALCOHOL PARA OBTENCIÓN DE UN MATERIAL FUNCIONALIZADO. 254

Campos-Medina, K.J. DESARROLLO DE PRODUCTOS TIPO BOTANA CON BASE EN UNA MEZCLA DE HARINA DE MAÍZ-HARINA DE CHÍCHARO. 255

*Ramírez-Ortega, A., y Rodríguez-Aguirre, P. DESARROLLO DE PRODUCTOS BOTANA ELABORADOS A PARTIR DE MEZCLAS DE HARINA DE MAÍZ-LENTEJA Y MAÍZ-LENTEJA GERMINADA..... 256

*[1]Orozco-Gutiérrez, G., [1]García-Preciado, J.C., [1]Bermudez-Guzmán, M., [2]De Lira-Fuentes, R.C., y [3]Segura-Escamilla, G. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE RESIDUO DE HUESO DE COCO PROCEDENTE DE LA INDUSTRIA DEL CARBÓN ACTIVADO EN COLIMA..... 257

González-Rosendo, G., García-Arellano, C.E., Quintero-Gutiérrez, A.G., Olvera-Contreras, G.L. y [*]Villanueva-Sánchez, J. APEGO AL CONSUMO DE UN REFRIGERIO CON SALVADO DE ARROZ Y EFECTOS EN COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS SANGUÍNEOS EN SUJETOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD. 262

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J.A. y [1,2]Vega-García, M.O. [1]Solano-Navarro, A., [1]López-González, C., [1]Domínguez-Carrillo, M.N., [2]González-Rosendo, G., [2]Villanueva-Sánchez, J. y [2]Quintero-Gutiérrez, A.G. CARACTERIZACIÓN DE POLVO DE NOPAL SECADO POR ASPERSIÓN. 269

[1]Salazar-Pérez, C.O., [2]Esquivel-Salgado, L., y [1*]Morales-Hernández, N. EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE FIBRAS NATURALES EN BASES DE PAN TIPO PIZZA. 271

[1]Olloqui-Pang, E., [1]Añorve-Morga, J., 1Castañeda-Ovando, A., [2]Evangelista-Lozano, S., [3]Alanís-García, E., [3]Ramírez-Moreno, E. y [4]Valadez-Vega, Ma. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA Y PASTA DE JATROPHA CURCA L. VAR. SEVANGEL PARA SU USO COMO POSIBLES INGREDIENTES FUNCIONALES EN LA DIETA. 275

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J.A. y [1,2]Vega-García, M.O. [1]Avendaño-Abarca, V.H., [2]Rodríguez-Fuentes, H., [1]Luna-Maldonado, A.I., [1]Vidales-Contreras, J.A.; [1]Márquez-Reyes, J.M. y [2]Munguía-López, J.P. INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE LUZ EN EL CRECIMIENTO Y ABSORCIÓN NUTRIMENTAL DE LECHUGA TIPO BABY BAJO SISTEMA DE PRODUCCIÓN FÁBRICA DE PLANTAS. 277

*Carballo-Méndez, F.J., Olivares-Sáenz, E., Váquez-Aalvarado, R.E., Zavala-García, F. y Sánchez-Alejo, E.J. EL SILICIO AUMENTA LA VIDA POSCOSECHA DE FRUTOS DE *Solanum lycopersicum* L. 278

[1]Mateo-Roque, P., [1]Cruz-Morán, Y.J., [1*]Luna-Suarez, S. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEMILLAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum)*. 279

[*]Estarrón-Espinosa, M., Morales-Hernández, N., Fernández-Flores, O. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL Y PERFIL VOLÁTIL DE GUSANO ROJO DE MAGUEY (*Comadia redtenbacheri*) COLECTADO EN EL ESTADO DE HIDALGO. 284

Jiménez-Osuna, G., García-Parra, M.D., y *Prado-Ramírez, R. DESMINERALIZACIÓN EN FLUJO CONTINUO DE LACTOSUERO BOVINO DULCE PROVENIENTE DE LA ELABORACIÓN DE QUESO PANELA EN LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO. 291

[1]Carreón-Betancourt, K., [3]Ponce-Hernández, S., [3]Obregón-Solís, E., [3]García-Fajardo, J.A., [2]Esquivel-Hernández, D.A. y [3]Reyes-Vázquez, N. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE NUEZ PECANA DE VARIEDADES CULTIVADAS EN EL ESTADO DE CHIHUAHUA. 302

[1]Ruiz-Palomino, P., [2]Virgen-Navarro, L., [1]Guatemala-Morales, G.M., [1]Hernández-Prudencio, E.J., [1]Rodríguez-Paredes, E. y [1]Beltrán-Medina, E.A. EFECTO DEL TIPO DE TOSTADO DE CAFÉ SOBRE EL AGRADO Y PREFERENCIA EN CONSUMIDORES UNIVERSITARIOS. 304

Suástegui-Vargas, G., Barrera-Chávez V.A., Padilla-de-la-Rosa, J.D., Villanueva-Rodríguez, S., y Guizar-González, C. EXTRACCIÓN DE SESAMOL APARTIR DE RESIDUO DE AJONJOLÍ (*Sesamum indicum L.)* PROVENIENTE DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ACEITE REFINADO. 306

Montoya-Salazar, D.I., Velasco-Ramírez, S.F.*, Salazar-Camarillo, V.M., Velázquez-Juárez, G., y Ramírez-Anguiano, A.C. EMPLEO DE COAGULANTES VEGETALES DE *Guazuma ulmifolia* LAM (CASCARA Y SEMILLAS) EN LECHE DE VACA. 313

[1]Salazar-Pérez, C.O, [2]Nava-Álvarez, G.I., y [*1]Morales-Hernández, N. EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE CREMA (pH Y ACIDEZ) DURANTE EL DESARROLLO DE QUESO CREMA Y SU IMPACTO EN LAS PROPIEDADES DE TEXTURA. 322

[1]Beltrán-Medina, E.A., [1]Guatemala-Morales, G.Ma., [2]Arriola-Guevara, E., [2]Corona-Gonzalez, R.I., [1]Mondragón-Cortés, P.M. y [1]Espinosa-Andrews, H. CARACTERIZACIÓN DE UN RESIDUO AGROINDUSTRIAL PROVENIENTE DEL PROCESAMIENTO DEL CAFÉ. 327

Martínez-Castillo, J.I., Polanco-Lugo, E.M.A., González-Flores, T., Pacheco-López, N.A, y *Ayora-Talavera, T.R. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE PECTINA A PARTIR DE RESIDUOS DE TORONJA Y MANDARINA. 329

[1]Núñez-Serrano, A.S., [2]Rodríguez-Buenfil, I.N., [3]García-Márquez, E., [3]García-Fajardo, J.A., [4]Esquivel-Hernández, D.A., y [3]*Reyes-Vázquez, N.C. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA CALIDAD FISICOQUÍMICA Y CONTENIDO DE FITOCOMPUESTOS EN CHILE PIQUÍN (*Capsicum annum* var. aviculare). 338

Tinoco-Mar, B.A., Barrera-Chávez, V.A., Padilla-de la Rosa, J.D., y Urías-Silvas, J.E. EFECTO DEL PROCESO DE DESLIPIDACIÓN SOBRE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE LA SEMILLA DE AJONJOLÍ (*Sesamum indicum* L). 348

[1]Barajas-Álvarez, P., [2]Haro-González, J.N., [2*]Espinosa-Andrews, H., y [1]Arriola-Guevara, E. DESARROLLO DE EMULSIONES DE ACEITE DE CAFÉ VERDE (*Coffea arabica*) POR ULTRASONICACIÓN. 354

*López-Ramírez, J., Mondragón-Cortez, P., Villanueva-Rodríguez, S., Orozco-Ávila, I., Estarrón-Espinosa, M., Chombo-Morales, P. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y TIPO DE INÓCULO EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL JOCOQUE. 363

Haro-González, J.N., y *Espinosa-Andrews, H. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE COMPLEJOS PROTEÍNA-POLISACÁRIDO. 371

[1]Villanueva-Sánchez, J., [1]Bravo-Rivera, G., [1]González-Rosendo, G., [1]Puga-Díaz, R., [1]Pérez-Alarcón, A.I., [2]Saldo-Periago, J. y [1]Quintero-Gutiérrez, A.G. COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA EXTRACCIÓN DE ACEITE DEL SALVADO DE ARROZ. 377

*Suárez-Jacobo, A., Leal-Huerta, R.Y., Ponce-Hernández, J.S. y Garcia-Fajardo, J.A. NON-THERMAL ALTERNATIVE APPLIED TO PUMPKIN SEED MILK FUNCTIONAL BEVERAGE. 379

[1*]Camacho-Quiroz, M., [2]Moreno-Fuentes, Á., [3]Garín-Aguilar, M.E., [1]Cruz-Solorio, A., y [1]Valencia-del-Toro, G. CULTIVO DEL "HONGO BLANCO PATÓN" (*Pleurotus albidus* [BERK.] PEGLER, 1983) RECURSO FÚNGICO ALIMENTICIO QUE CRECE Y SE CONSUME EN EL NORTE DE HIDALGO, MÉXICO. 380

[1]Astudillo-Melgar, F., [2]Utrilla-Carreri, J., [3]Ochoa-Leyva, A., y [1]*Huerta-Beristaín, G. PRINCIPALES BACTERIAS PRESENTES EN LA TUBA GUERRERENSE Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO. 386

*Jaimez-Ordaz, J., Hernández-Serna, Y., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., Añorve-Morga, J., González-Olivares, L.G. y Castañeda-Ovando, A. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE UN QUESO DE ARO ELABORADO CON LECHE PASTEURIZADA BAJO CONDICIONES ESTANDARIZADAS. 391

Vazquez-Loera E.D, Perez-Lira J.A, *Suárez-Jacobo A, Garcia-Fajardo J.A, Orozco-Avila I. QUALITY EVALUATION OF OIL FROM PUMPKIN SEEDS EXTRACTED BY ULTRASOUND. 393

*[1]Valenzuela-Cobos, J.D., [2]Garín-Aguilar, M.E., [1]Sánchez-Hernández, A., [3]Leal-Lara, H., y [1]Valencia-del-Toro, G. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE CEPAS RECONSTITUIDAS DE HONGOS COMESTIBLES *Pleurotus* Y *Lentinula* EN MEDIOS DE CULTIVO 394

[1]Medina-Rendon, E.A., [1]Arriola-Guevara, E., [2]Guatemala-Morales, G.Ma., [2]Fernandez-Flores, O., [2]Espinosa-Andrews, H., [2]Morales-Hernández, N. y [2]Beltrán-Médina, E.A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO DE MEZCLAS PARA LA OBTENCIÓN DE UN ALIMENTO EXTRUIDO, APROVECHANDO LOS RESIDUOS DEL MANGO. 399

[1]Gutiérrez-Ramírez, A.M., [1]Arriola-Guevara, E., [2]Guatemala-Morales, G.M., [2]Morales-Hernández, N., [1]Mondragón-Cortés, P.M. y [2]Beltrán-Medina, E.A. CARACTERIZACIÓN DE ALIMENTOS EXTRUDIDOS TIPO BOTANA OBTENIDOS MEDIANTE UN DISEÑO DE MEZCLAS. 401

[1]Polanco-Lugo, E., [1,2]Rizo-Tafolla, E., [1]Martínez-Castillo, J., [1]Pacheco-López, N. y [1]Ayora-Talavera, T. CARACTERIZACIÓN DE ALMIDÓN DE MUSA SP. OBTENIDO MEDIANTE MÉTODO DE EXTRACCIÓN VERDE. 402

[1]Rodríguez-Valadez, M. y [2]Castillo-Herrera, G.A. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MANZANILLA OBTENIDOS MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y LIXIVIACIÓN CON SOLVENTES. 403

[1]Callejas-Hernández, J., [2]Hernández-Guzmán, F.J., [1]Rodríguez-Ortega, A., [1]Cruz-Vera, I., [1]Landero-Valenzuela, N., [1]Lara-Viveros, F.M. y [3]Bustamante-Espinosa, L.V. AMARANTO: ALTERNATIVA PRODUCTIVA EN ELVALLE DEL MEZQUITAL, HIDALGO. 404

*Estarrón-Espinosa, M., López-Ramírez, J.E. EXPLORACIÓN DE LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL EN LA NATA SUPERFICIAL FORMADA EN TANQUES DE ALMACENAMIENTO DE "ORDINARIO". 405

Jaramillo-Colorado, B.E., Palácio- Herrera, F.M. RESIDUES OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES IN FRUITS OBTAINED FROM MARKETS AND SUPERMARKETS IN CARTAGENA CITY, (COLOMBIA). 410

[1]Cortés-Culebro, D.N., [1]González-González, C.R., [2]Beltrán-García, M.J. BUSQUEDA DE ANTIMICROBIANOS EN MICROORGANISMOS AISLADOS DEL QUESO TIPO CHIAPAS. 411

BIOLOGÍA

*Hernández-Sepúlveda, J.A., Góngora-Gómez, A.M., Domínguez-Orozco, A.L., Villanueva-Fonseca, B.P. CICLO GAMETOGÉNICO DE ORGANISMOS TRIPLOIDES DE OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas* CULTIVADOS EN EL ESTERO BACOREHUIS, AHOME, SINALOA. 412

[1]*Labrada-Martagón, V., [2]Muñoz-Tenería, F.A. y [3]Zenteno-Savín, T. OXIDATIVE STRESS AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN GREEN TURTLE (*Chelonia mydas*) AFLICTED WITH FIBROPAPILLOMA IN MEXICAN CARIBBEAN. 421

[*]Góngora-Gómez, A.M., García-Ulloa-Gómez, M., Sotelo-Gonzalez, M.I., y Santamaría-Miranda, A. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA ALMEJA SIFÓN *Panopea globosa* (DALL, 1898) EN EL SISTEMA LAGUNAR ENSENADA PABELLONES NAVOLATO, SINALOA. 430

*Hernández-Sepúlveda, J.A., Góngora-Gómez, A.M., Villanueva-Fonseca, L.Z., Humberto-Sepúlveda, C. EMBRIOGÉNESIS DEL CARACOL COBO DEL PACÍFICO *Strombus gracilior* (STROMBIDAE) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO DURANTE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA..... 440

*Góngora-Gómez, A.M., Humberto-Sepúlveda, C., Sotelo-González, M.I., García-Ulloa-Gómez, M. DESARROLLO GAMETOGÉNICO DEL OSTIÓN DE PLACER *Crassostrea corteziensis* (HERTLEIN, 1951), DURANTE UN CICLO DE CULTIVO, EN EL ESTERO LA PITAHAYA, GUASAVE, SINALOA. 445

[*]Hernández-Sepúlveda, J.A., Góngora-Gómez, A.M., Villanueva-Fonseca, B.P., y Domínguez-Orozco, A.L. CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS (PLOMO, COBRE, CADMIO, ZINC Y MERCURIO) EN TEJIDO DE OSTIÓN DEL PACÍFICO *Crassostrea gigas* DIPLOIDES Y TRIPLOIDES CULTIVADO EN EL ESTERO LA PITAHAYA, GUASAVE, SINALOA. 450

[1]Gottfried-Burguett, E. y [1]Flores-Garnica, J.G. DEFINICIÓN DE ECOREGIONES PARA LA ESTIMACIÓN DE EMISIONES DE CARBONO BASADAS EN LOS TIPOS DE VEGETACIÓN DEL ESTADO DE JALISCO. 463

*Góngora-Gómez, A.M., Villanueva-Fonseca, L.C., Domínguez-Orozco, A.L., y García-Ulloa-Gómez, M. DESARROLLO INTRACAPSULAR DEL CARACOL CHINO ROSADO *Hexaplex erythrostoma* EN CONDICIONES DE LABORATORIO. 465

[1*]Ramírez-Zamora, J., [2]Flores-Macías, A., [3]Salinas-Sánchez, D.O., y [4]Figueroa-Brito, R. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Dodonaea viscosa* (SAPINDACEAE) SOBRE LA CANTIDAD DE HEMOCITOS DE *Spodoptera exigua* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). 469

[1]Gaxiola-Morales, M.G. y [1]Brito-Castillo, L. UMBRAL DE SEQUÍA EN EL DESIERTO SONORENSE. 475

[1]Rengifo-Guerrero, C.A., [1]Piña-Zaballa, K.F., [2]Vásquez-Murrieta, M.S., y [1*]Franco-Hernández, M.O. DINÁMICAS DE CARBONO Y NITRÓGENO EN SUELOS SALINOS CONTAMINADOS CON THINNER. 477

*Chávez-Morales, R.M., Chávez-Almanza, J.A., Araiza-Velázquez, H., Sigala-Rodríguez, J.J., Hernández-Alfaro, E.T., Moreno-Hernández-Duque, J.L., Regalado-Soto, D.I. COMPARACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DEL VENENO DE TRES ESPECIES DE SERPIENTES DE CASCABEL (*Crotalus lepidus*, *C. molossus* y *C. scutulatus*) DISTRIBUIDAS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO. 483

*Chávez-Padilla, M., Benavides-Solorio, J. y Flores-Garnica, J.G. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CLIMÁTICAS EN LA PRESENCIA DE INCENDIOS FORESTALES A NIVEL NACIONAL Y REGIONAL DEL AÑO 2005 AL 2014. 492

[1]del-Real-Olvera, J., [2]Garza-Galicia, A. y [1]Merino-Solís, Ma. EMPLEO DE HUMEDALES ARTIFICIALES DE FLUJO SUBSUPERFICIAL HORIZONTAL EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MUNICIPALE: UN CASO DE ESTUDIO. 494

[1]Aguilar Saldaña, J.D. y [2]*Espinoza Escalante, F.M. EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA EN LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA SOBRE LA VEGETACIÓN DEL BOSQUE DE LA PRIMAVERA..... 496

Santana-Acosta, L.E., Trejo-Calvillo, M.A., Martínez-Peña, B., Ismael-Mohamed, S., Ponce-Campos, P., y Sahagún-Godínez, E. LISTADO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES EN LA BARRANCA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA..... 497

Arredondo-Flores, L.A. y Olvera-Mariscal, A.I. COMUNICACIÓN CON MENÚ INTERACTIVO, A TRAVÉS DE LAS SEÑALES ELÉCTRICAS DEL OJO HUMANO..... 498

[1]Sahagún-Godínez, E. y [2]Zavala-Aguirre, J.L. USO DE PLANTAS PARA EL CONTROL DE LA EROSION EN CUERPOS DE AGUA. 499

[1]Castañeda-Robles, V.B., [1]Zaragoza-Araujo, U. y [1]*Zavala-Aguirre, J.L. TASA DE DEGRADACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA, DURANTE UN CICLO ANUAL, DENTRO DEL APFF BOSQUE LA PRIMAVERA, JALISCO, MÉXICO..... 500

[1]Rodríguez-Sánchez, A.A., [2]Sahagún-Godínez, E. y [3]Herrera-Larrasilla, T. EL CONTROL QUÍMICO NO TÓXICO DEL MUÉRDAGO *Struthanthus interruptus* Mart. (LORANTHACEAE) EN UN ENTORNO URBANO. 501

[1]Reyes-Salazar, A.K., [1]Zaragoza-Araujo, U. y [1]*Zavala-Aguirre, J.L. PRODUCTIVIDAD PRIMARIA NETA ÁEREA, DURANTE UN CICLO ANUAL, DENTRO DEL APF BOSQUE LA PRIMAVERA, JALISCO, MÉXICO. 502

[1]Bello-Chamorro, D., [1]Zavala-Aguirre, J.L. y [2]*Reyes-Rueda, J. DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN SEDIMENTOS Y LIRIO ACUÁTICO *Eichornia crassipes* (Solms-Laubach) DE LA LAGUNA DE CAJITITLÁN, JALISCO, MÉXICO. 503

[1]Sandoval-García, K., [1]García-Rodriguez, R.V., [2]Doyle, R.D., [3]Mora-Heredia, E., y [2,3]Dávalos-Lind, L. TASA DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN UN LAGO TROPICAL DE LOS TUXTLAS, VERACRUZ..... 505

BIOTECNOLOGÍA

[1*]Moreno-Valencia, F.D., [1]Plascencia-Espinosa, M.A., [1]Luna-de-Jesús, Karina, [2]Muñoz-Rojas, J. ESTUDIO DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL PARA SU APLICACIÓN EN ESPECIES FORESTALES COMERCIALES. 507

*Cuevas-Moreno, J.A., González-Prieto, J.M., Castríta-Domínguez, P. y Méndez-Morán, L. IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN RESPUESTA A LA INTERACCIÓN CON *Macrophomina phaseolina* EN *Arabidopsis thaliana*..... 517

[1]Arámbula-Zúñiga, C.C. y *Chan-Cupul, W. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OXIDATIVA Y PRODUCCIÓN DE H2O2 POR *Pycnoporus sanguineus* EN INTERACCIONES INTERESPECÍFICAS CON HONGOS SAPROBIOS DE SUELO. 518

[1]*Pacheco-Aguilar, J.R., [1]Chávez-Ambriz, L.A., [2]Hernández-Morales, A., [3]Cabrera-Luna, J.A. y [1]Luna-Martínez, L. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE CEPAS DE BACILLUS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Mammillaria scheidweileriana*. 519

*Baltazar-Díaz, T.A., Brena-Becerril, A. y Vizcaíno-Rodríguez, L. A CO-EVOLUTIONARY APPROACH OF SERPINS AND SERINE PROTEASES USING MIRROTREE METHOD. 521

González-Chávez, R., y [*]Beltrán-García, M. DUPLICACIÓN GÉNICA EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE TAXOL EN LA PLANTA DE BANANO (*Musa acuminata*). 523

[1]*Garcia-Rubido, M., [2]Espinosa-Rivera, R., [1]Cruz-Hernandez, Y., [1]Acosta-Aguiar, Y. y [1]Martinez-Acosta L. EFECTO DE *Canavalia ensiformis* INOCULADA CON MICORRIZAS Y REDUCCIÓN DEL FERTILIZANTE MINERAL EN EL CULTIVO DEL TABACO. 524

*Ibave-González, J.L. y Badillo-Lucero, J. LA SUSTENTABILIDAD AGROALIMENTARIA Y LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS ¿CAMPMONSANTO? 525

[1]*Ramos-Ibarra, M.L., [2]Alarcón-Aparicio, E., [2]Sánchez-Arreguín, C.G., [3]Torres-Bugarín, O., [2]Gerónimo-Guzmán, R.I., [4]Chávez-Servia, J.L., [3]Zavala-Aguirre, J.L., [1]Valderrama-Cháirez, M.L., [5]Mendoza-Roaf, P.L. LAS ANTOCIANINAS DE TORTILLA DE MAÍZ AZUL (RAZA MIXTECO): PROTECTORAS DE DAÑO MICRONUCLEOGÉNICO. 526

Ávila-Torres, D.A., Meza-Carmen, V. y *Altamirano-Hernández, J. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE AGAVE PULQUERO. 528

[*]García-Osuna, H.T. Ramírez-Godina, F., y Torres-Tapia, M.A. PRODUCCIÓN DE SEMILLA SINTÉTICA DE *Mammillaria coahuilensis* (BOED) Y *Mammillaria carmenae* (CASTAÑEDA). 530

[1,3*]Rebolledo-Alarcón, M.A, [2]Carmona-Escutia, R.P., [2]Villanueva-Rodríguez, S., y [3]García-Parra M.D. EVALUACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS NATIVAS Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO, COMO BIO-CONSERVADORES, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS, DURANTE LA MADURACIÓN DE UN CHORIZO MEXICANO. 535

*Vargas-Romero, M.C., Saldaña-Robles, A., Gomez-Luna, B.E. y Ruiz-Aguilar, G.M.L. CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS DERIVADAS DE TRAMETES VERSICOLOR UTILIZANDO UN COPOLÍMERO DE ACRILAMIDA Y ACRILATO DE POTASIO. 544

[1]*Torres-Tapia, M.A., [2]Zamora-Villa, V.M., [2]Jaramillo-Sánchez, M.A., [2]Ramírez-Godina, F., y [2]García-Ozuna, H. EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTO A SEMILLAS DE MAÍZ CON PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA CONTRARRESTAR *Fusarium moniliforme.* 546

[1]Aranda-Díaz, S., [2]Huerta-Robles, A.X., y [1]Beltrán-Garcia, M.J. DESARROLLO DE UN MÉTODO MOLECULAR PARA EVALUAR LA COLONIZACIÓN DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS. 552

Saracho-Peña, A.G., López-Valenzuela, J.A., Quintero-Soto, M.F., Salazar-Salas, N.Y., López-Moreno, H.S., Pineda-Hidalgo, K.V., Garzón-Tiznado, J.A. y *Chávez-Ontiveros, J. IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS RELATED TO THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CHICKPEA GENOTYPES. 554

*Hernández-Navarro, A., Jiménez-Castañeda, V., Sánchez-Ríos, J.L., Perea-Cantero, A. y Sánchez-Martínez, M.C. MANEJO SUSTENTABLE DE MELOIDOGYNE INCOGNITA UTILIZANDO EL EXTRACTO VEGETAL DE (LEUCAENA LEUCOCEPHALA) EN EL CULTIVO DE (*Lycopersicum esculentum*) EN ATLATLAHUCAN, MORELOS. 556

*Jiménez-Castañeda, V., Cuellar-Yañez, N.B., Nava-Gómez, S., Dorado-Morales, M. y Sánchez-Rios, J.L. HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum L.*) EN ATZALAN VERACRUZ.557

[1]Jiménez-Castañeda, V., [1]Galarza-Ballesteros, A., [1]López-Morales, J.C., [1]Peralta-Muñoz, C.A., [1]Quintana-Solis, J., [1]Rangel-Urbina, R., [1]Sánchez-Rios, J.L. y [2]Hernández-Navarro, A. IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa L.*) EN MIXQUIC. 558

[1]*Cedeño, G., [2]Gerding, M., [3]Inostroza, L. y [2]Ficher, S. TOLERANCIA AL DÉFICIT HÍDRICO EN EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa*) CO-INOCULADO CON PGPR CON ACTIVIDAD ACC DEAMINASA. 559

[1]Tirado-Pérez, B., [1]Qui-Zapata, J., [1]Rodríguez-Garay, B., y [1]*Gutiérrez-Mora, A. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y TIPO DE EXPLANTE EN LA INDUCCIÓN DE CALLO DE ESTEVIA. 560

[1] [2]*Bazaldúa, C., [2]Cardoso-Taketa, A. y [2]Villarreal, M.L. INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE PODOFILOTOXINA EN UNA LINEA DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Hyptis suaveolens*. 567

[1]Galicia-Campos, S.C., [2]Salcedo-Martínez, S.M., [3]Aldama-Aguilera, C., [1]Vidales-Contreras, J.A., y [1]García-Gómez, C. MICROALGAS AISLADAS DE GRANJAS PORCINAS PARA LA REMOCIÓN DE ORTOFOSFATO Y AMONIO DE AGUAS RESIDUALES. 574

[1]*Hernández-Martínez, A., [1]Galicia-García, T., [2]Vega-Ríos, A., [3]Béjar-Hinojosa, M. y [1]Rascón-Cruz, Q. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE HARINA DE TRITICALE. 582

[1]*Guzmán-Rodríguez, L.F., [1]Pichardo-González, J.M., [1]Cortés-Cruz, M.A., [2]Muñoz-Hernández, J., y [1]García-Muro, A.M. MONITORIZACIÓN DE LA PRESENCIA ADVENTICIA DE EVENTOS TRANSGÉNICOS EN ACCESIONES DE ALGODÓN PARA CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO EN BANCO DE GERMOPLASMA. 584

[*]Bermúdez-Guzmán, M.J., Orozco-Gutiérrez, G., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J.J., y García-Mariscal, K.P. USO DE MARCADORES MOLECULARES SSR PARA LA DETECCIÓN DE PLANTAS CIGÓTICAS DE LIMÓN MEXICANO. 589

[*]Bermúdez-Guzmán, M.J., Orozco-Gutiérrez, G., Cervantes-Preciado, J.F., y García-Preciado, J.C. IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL SCYLV EN *Saccharum* spp. EN LA REGIÓN CAÑERA DEL PACÍFICO DE MÉXICO. 596

*Baños-Lara, G., Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., González-Olivares, L. G. y Jaimez-Ordaz, J. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE PESCADO Y ACEITE DE PESCADO ENCAPSULADO EN EL PERFIL QUÍMICO Y SENSORIAL DE LA CARNE DE POLLOS DE ENGORDE (ROSS). 603

*Baños-Lara, G., Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., González-Olivares, L.G. y Jaimez-Ordaz, J. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE PESCADO Y ACEITE DE PESCADO ENCAPSULADO EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE POLLOS DE ENGORDE (ROSS). 605

Farías-Álvarez, L.J., Gschaedler-Mathis, A., Arellano-Plaza, M., Amaya-Delgado, L., y *Herrera-López, E.J. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO DEL INÓCULO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR LA LEVADURA *Xanthophyllomyces dendrorhous.* 607

[1,2*]Brena-Becerril, Alejandro., [3]Vinuesa, F.P., y [4]Valderrama-Blanco, M.B. SIGNIFICADO EVOLUTIVO Y ECOLOGICO DE LA PARALOGIA EN ENZIMAS OXIDASAS DEPENDIENTES DE COBRE EN BACTERIAS. (EVOLUTIVE AND ECOLOGICAL MEANING OF THE PARALOGY IN DEPENDENT COPPER OXIDASE ENZYMES IN BACTERIA). 614

[1]Valle-Hernández, Silvia., y [1,2*]Brena-Becerril, Alejandro. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE MICROORGANISMOS Y PLANTAS DENTRO DEL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA Y COBALAMINA MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. (PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF MICROORGANISMS AND PLANTS WITHIN THE METABOLISM OF HOMOCYSTEIN AND COBALAMINE THROUGH BIOINFORMATIC ANALYSIS). 626

[1]Padilla-Martínez, L.F., [2]Lara-Lozano, M., [3]Islas-Rodríguez, A., [1]Gutierrez-Garcia, G.J., [2]González-Barrios, J.A., y [1*]Álvarez-Maya, I. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GENOMA COMPLETO DE UNA CEPA SENSIBLE DE *Mycobacterium tuberculosis* DEL ESTADO DE JALISCO. 634

Martínez-Ortíz, S.G., Marín-Sánchez, J., Delgado-Sánchez, P., Ortíz-Rodríguez, J.C. y *Villegas-Rodríguez, F. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE 2 CEPAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO ESTIMULANTES Y PROMOTORES DE GERMINACIÓN SOBRE SEMILLAS DE TOMATE SILVESTRE (*Physalis sp*.). 641

[1+]Mora-Vázquez, José A., [1,2*]Brena-Becerril, Alejandro. ESTUDIOS FILOENZIMÁTICOS DE ANTOCIANINAS EN *Zea mays L.* Y OTROS ORGANISMOS PARA EVITAR EL AUMENTO DE HIPERTROFIA DE LOS ADIPOCITOS EN HUMANOS CON DIETA RICA EN GRASAS. ("STUDIES FILOENZYMATIC OF ANTHOCYANINS IN *Zea mays L.* AND OTHER ORGANISMS TO AVOID THE INCREASE OF HYPERTROPHY OF ADIPOCYTES IN HUMAN WITH HIGH FAT DIET"). 643

[1]Ochoa-Mojica, O.R., [2]Aguilar-Lemarroy, A.C., [2]Jave-Suarez, L.F., [1]Padilla-Camberos, E., [1]Oaxaca-Camacho, A.R., [3]Muñoz-Valle, F., [4]Moreno-Brito, V., y [1*]Hernández-Gutiérrez, R. OBTENCIÓN DE BIOMARCADORES RECOMBINANTES PARA SU USO EN LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ESPECÍFICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. 650

Salazar-Bautista, E., Cruz-Moran, Y.J., y [*]Luna-Suárez, S. EXTRACCIÓN DE MUCILAGO DE CHÍA (*Salvia hispánica L*.) POR MEDIO DE SONICACIÓN. 661

Cruz-Morán, Y.J., [*]Luna-Suarez, S. PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD ÁCIDA DE LA AMARANTINA (GLOBULINA 11S). 665

[1]González-Ruíz, A.V., [1,2*]Bautista-Rosales, P.U., [2]Palomino-Hermosillo, Y.A., [3]Ramírez-Ramírez, J.C., [1,2]Balois-Morales, R., y [4]Cortes-Cruz, M.A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO. 671

[1*]Lazcano-Díaz, E., [1]Padilla-Camberos, E., [1]Martínez-Velázquez, M., [2]Castillo- Herrera, G., [2]Estarron-Espinosa, M. ACARICIDAL EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM *Citrus sinensis* AGAINST CATTLE TICK *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* 679

[1]Rengifo-Guerrero, C.A., [2]Vásquez-Murrieta, M.S., [1*]Franco-Hernández, M.O. DETERMINACIÓN DE COMPONENTES DEL THINNER EN SUELO Y SU EFECTO SOBRE LA LOMBRIZ DE TIERRA ROJA CALIFORNIANA. 684

*Tovar-Jiménez, X., Álvarez-Gacía, R., Favela-Torres, E. y Tellez-Jurado, A. ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL LIRIO ACUÁTICO (*Eichhornia crassipes*)..... 690

Cortés-Mendoza, L.J., González-Martín, N., Téllez-Jurado, A. y *Tovar-Jiménez, X. HIDRÓLISIS QUÍMICO-BIOLÓGICA DE HOJA DE LIRIO ACUÁTICO PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES. 691

Tovar-Hernández, I., Marín-Sánchez, J., Vázquez, A. y *Villegas-Rodríguez, F. EFECTO DE LA INOCULACION DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS EN SEMILLAS DE MELÓN (*Cucumis melo*). 692

[1,2]*Olvera-Maldonado, M., [2]Llanos-Romero, R.E., [1]Villa-Hernández, J.M. y [2]Herrera-Santoyo, J. ESTUDIO QUÍMICO Y DE CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Psittacanthus rhynchantus* (BENTH.) *Kuijt loranthaceae*. 694

González-Martín, N., Téllez-Jurado, A. y *Tovar-Jiménez, X. OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO XILANOLÍTICO A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM EMPLEANDO COMO SUSTRATO TALLO DE *Eichhornia crassipes*..... 696

[1]*Sánchez-Hernández, A., [1]Valenzuela-Cobos, J.D., [2]García-Ornelas, B., [2]Leal-Lara, H., [3]Garín-Aguilar, Ma. E. y [1]Valencia-del Toro, G. MONOCARIOTIZACIÓN DE PLEUROTUS ERYNGII POR DEDICARIOTIZACIÓN QUÍMICA Y PRODUCCIÓN DE PROTOPLASTOS..... 697

*[1]Vargas-Farías, C., [1]Vásquez-Veliz, G.K., [2]Valenzuela-Cobos, J.D., [3]Garín-Aguilar, M.E., y [2]Valencia-del-Toro, G. BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA FRUCTIFICACIÓN DE *Pleurotus* spp. 698

*Guzmán-Othón, D., Cervantes-Martínez, J. MICROESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS. 702

García-García, F.J., Montañez-Soto, J.L., Angoa-Pérez, M.V., Mena-Violante, H., Oyoque-Salcedo, G. y *Oregel-Zamudio, E. ESTUDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE HOJAS DE MORINGA. 708

Villalobos-Ornelas, A. y *Brena-Becerril, A. BIOINFORMATICA DE PROTEÍNAS REGENERADORAS DE TEJIDOS. 709

[*]Urue-Corral, A., Martínez-Velázquez, M., Villanueva-Rodríguez, S., Ramos-Jerz, R., Padilla-Camberos, E. Cortes-Álvarez, C.R., y Bolaños-Carrillo, M.A. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN EXTRACTO DE SEMILLA DE AGUACATE *(Persea americana MILL*) EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.... 710

García-Ruelas, M.A., Chávez-Rivera, R. y Ortiz-Alvarado, R. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS LIBRES DE SOLVENTES ORGANICOS DE *P. Serotina* VAR. CAPULI. 714

Vega-Barriga, C.G., Becerril-Varela, K. y *Guerrero-Barajas, C. OXIDACIÓN BIOLÓGICA DE SULFURO DE HIDRÓGENO Y SULFATO FERROSO MEDIANTE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO..... 719

[1]Alcántar-Calderón, U.Y., [1]Salazar-Torres, J.A., [2]Madrigal-Pérez, L.A., [1]Garambullo-Peña, T.I., y Juan Carlos [1*]González-Hernández, J.C. ANÁLISIS DE LA RESPIRACIÓN CELULAR EN LEVADURAS NO CONVENCIONALES MEDIANTE UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS. 721

[1]Ramírez-Conejo, J.D., [1]Rendón-Castañeda, I.N., [1,2]Márquez-López, A., [2]Chávez-Parga, M.C., [1]Valencia-Flores, D.C., [1]Álvarez-Navarrete, M., y [1*]González-Hernández, J.C. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β-GLUCOSIDASA EN LEVADURAS NO-CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE FRUTILLAS. 727

Zamora-Andrade, C.A., Perrusquia-Hereida, R. Ma., González-González, Ma., y *Joaquín-Ramos, A. EFECTOS ANTAGONISTA Y ANTIMICROBIANO DE HONGOS AISLADOS DEL MICROBIOMA DE NOPALES SILVESTRES (*Opuntia spp*.) 732

Solórzano-Villanueva, V., Covián-Nares, F., Garambullo-Peña, T.I., y *González-Hernández, J.C. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE BACTERIAS PRESENTES EN ELPROCESO DE FERMENTACIÓN DEL MEZCAL. 734

Flores-Cosio, G., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., y *Amaya-Delgado, L. COMPARACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* Y *Kluyveromyces marxianus* EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL, ÉSTERES Y ALCOHOLES SUPERIORES. 739

Guzmán-Othón, D., Dávila-Vázquez, G., Bravo-Madrigal, J. y *Cervantes-Martínez, J. MICROESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS. 746

Valle-Hernández, S. y *Brena-Becerril, A. RELACIONES FILOGENETICAS DE MICROORGANISMOS Y PLANTAS DENTRO DEL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEINA Y COBALAMINA MEDIANTE EL ANÁLISIS. 748

*Chávez-Vela, N.A., Salinas-Miralles, E.Ma., Jáuregui-Rincón, J., Medina-Ramírez, I.E., Flores-Montañez, L., Moreno-Córdova, E.V. y Moreno-Hernández, D.J.L. DETECCIÓN POR UN SISTEMA ELISA DEL CONTAMINANTE EMERGENTE ESTREPTOMICINA EN AGUA RESIDUAL. 750

Alvarez-Guzmán, C.L., Balderas-Hernández, V.E., *De León-Rodríguez, A. PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES POR CEPAS PSICRÓFILAS AISLADAS DE LA ANTÁRTICA A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. 752

[1]Mejía-Baez L. y [1*]Brena Becerril, A. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PEROXIDASAS LIGNINOLITICAS PRESENTES EN HONGOS DE PUDREDUMBRE BLANCA PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS FULVICOS A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELUOSICOS Y SU POSTERIOR UTILIZACIÓN COMO ANTIOXIDANTE NATURAL. (BIOINFORMATICAL ANALYSIS OF LIGNINOLYTIC PEROXIDASES PRESENT IN WHITE DAISY FUNGI FOR THE OBTAINATION OF FULVIC ACID FROM LIGNOCELUOSIC RESIDUES AND THEIR SUBSEQUENT USE AS A NATURAL ANTIOXIDANT). 754

Paz-Macías, J.M. y Brena-Becerril, A*. RELACION DE HOMOLOGÍA DEL POLIFENOL-FLAVONOIDE MIRICETINA DE EFECTO ANTIOXIDANTE EN LAS BERRIES PARA ENCONTRAR FUENTES ALTERNATIVAS DE PRODUCTOS ANTIOXIDANTES Y BIOMEDICAMENTOS. 756

Graciano-Martínez, D., Castañeda-Mejía, F.A., Macedo-Raygoza, G.M., Peralta-Mendoza J. A., Balleza-Mejía, D. y Beltrán-García, M.J. IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LIPOPÉPTIDOS EN *Bacillus subtilis* BD2-22. 757

INGENIERÍA QUÍMICA

[1*]Serrano, M., [1]Garzón, G., [1]Pedraza, J. y [2]Ríos, F. APLICACIÓN DE UNA MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO PARA DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS SINTÉTICAS..... 758

[1]Roque-Betanzos, H.E., [1]Ramírez-Frausto, C., [1]García-Parra, M.D., [1*]Prado-Ramírez, R., y [2]Escalante-García, Z.Y. DESMINERALIZACIÓN DE LACTOSUERO DULCE BOVINO DE LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO POR MEDIO DE RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO. 759

*Botello-Pozos, J.C., Pérez-Damián, G., Reyes-Sánchez, L.B., y Morales-Galicia, M.L. DESARROLLO Y ESCALADO DE VALORACIONES ÁCIDO-BASE PARA FAVORECER LA ENSEÑANZA DE ESTE EQUILIBRIO EN ALUMNOS DE LICENCIATURAS DEL ÁREA QUÍMICA Y DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS. 769

*Botello-Pozos, J.C., Pérez-Saavedra, J.J., Macías-Hernández, C., y Montiel-Franco, R. DESARROLLO DE ELECTRODOS DE PELÍCULA DE OXIDO SOBRE ACERO INOXIDABLE (POSAI) COMO ALTERNATIVA PARA VALORACIONES ÁCIDO-BASE. 773

[*]Cáñez-Carrasco, M.G., García-Alegría, A.M., y Orduño-Fragoza, O. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO A MICRO, SEMI-MICRO Y MACRO ESCALA PARA TITULACIÓN ACIDO BASE. 777

[1]García-Grajeda, B.A., [2]Águila, S.A., [1]Peinado-Guevara, H., [3]Ochoa-Terán, A., [1]Cruz-Enríquez, A., y [1]*Campos-Gaxiola, J.J. DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE IONES Cr^{3+} USANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON EL ÁCIDO 11-MERCAPTOUNDECILFOSFÓNICO EN MEDIO ACUOSO. 787

[1]Espinoza-Carrión, L.G., [1]Verduzco-Navarro, I.P., [1]Mendizábal-Mijares, E., [2]Ávila-Rodríguez, M., y [1]*Ríos-Donato, N. ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE IONES CADMIO EN DISOLUCIÓN ACUOSA MEDIANTE PERLAS DE ALGINATO-SULFATO DE QUITOSANA. 795

Verduzco-Navarro, I.P., Álvarez-Vázquez, D., Yáñez-Barragán, S.I., Jasso-Gastinel, C.F., Martínez-Madrigal, S. y *Mendizábal-Mijares, E. REMOCIÓN DE COLORANTE ROJO 40 DE SOLUCIONES ACUOSAS MEDIANTE COLUMNAS DE PERCOLACIÓN. 796

Ramírez-Ortiz, V.C., Martínez-Madrigal, S., Jasso-Gastinel, C.F., Ríos-Donato, N., Martínez-Gómez, A. y *Mendizábal-Mijares, E. ADSORCIÓN DE COLORANTE ROJO 40 POR PERCOLACIÓN ACUOSA EN UNA COLUMNA EMPACADA DE PARTÍCULAS DE COMPOSITO DE QUITOSANA DISPERSA EN POLIURETANO.797

[1*]Villagómez-González, B. B. y [2]Soto-Castro, D. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANÁLOGOS DE DIOSGENINA..... 799

[1*]Villagómez-González, B.B. y [2]Soto-Castro, D. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO 4-OXO-4-(PROP-2-INO-1-ILOXI) BUTANOICO EN SÓLIDO. 800

Campos-Carrillo, S.E., García-Fajardo, J.A., Estarrón-Espinosa, M., Padilla-De la Rosa, J.D., *Ponce-Hernández, J.S. FRACCIONAMIENTO DE UN ACEITE ESENCIAL DE TORONJA MEDIANTE DESTILACIÓN MOLECULAR. 802

Hernández-Hernández, M., Polanco-Lugo, E.M.A., Martínez-Castillo, J.I., Pacheco-López, N.A., y [*]Ayora-Talavera, T.R. ENCAPSULACIÓN POR GELIFICACIÓN IÓNICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CON ALGINATO DE SODIO Y MUCÍLAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica*). 809

[1]Martínez-Candela, E., [1]Padilla-de la Rosa, J.D., [2*]Vallejo-Cardona, A.A.NANO ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE SUBPRODUCTOS AGRO INDUSTRIALES PARA EVALUAR SU EFECTO PROTECTOR DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA..... 816

[1*]Torres-Castro, G.M., [2]López-Ramírez, J.E. y [2]Castillo-Herrera, G.A. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE LIXIVIACIÓN DE CAPSAICINOIDES DE CHILE HABANERO MEDIANTE ACEITES VEGETALES..... 825

Becerril-Varela, K., Serment-Guerrero, J.H., Monterrubio-Badillo, Ma., Bremauntz-Michavila, P. y *Guerrero-Barajas, C. DETERMINACION DE LA REDUCCIÓN DE Fe +3 Y LA GENERACIÓN DE ENERGÍA POR UN CONSORCIO ENRIQUECIDO DEL EFLUENTE DE UN PROCESO SULFUROGÉNICO. 827

*Espinoza-García, K., Ramírez-Hernández, A. y Marcos-Fernández, A. DEGRADACIÓN DE BOTELLAS DE POLI (ETILEN TEREFTALATO) (PET). 829

[1]del-Real-Olvera, J., [1]García-Alonso, A., [2]Sulbaran-Rangel, B.C. y [2]Guzmán-González, C. REMOCIÓN DE LA CIPROFLOXACINA PRESENTE EN AGUAS SINTETICAS EMPLEANDO DIATOMITA COMO ADSORBENTE NATURAL..... 830

Venegas-Reynoso, A., Carbajal-Arízaga, G.G., y *Velázquez-Juárez, G. SÍNTESIS DE HDLs DE Zn-Al, Co-Al, Cu-Al y Ni-Al COMO SOPORTES PARA INMOVILIZACIÓN POR AFINIDAD. 832

[1]Sánchez-R., O.A.; [2]Ibarra-W., R.; [1]Herrera-L, T.E. FORMULACIÓN DE UN SISTEMA DE RESINA EPOXICA DE DOBLE CURADO PARA LA PREPARACIÓN DE UN PREIMPREGNADO ESTABLE A TEMPERATURA AMBIENTE. 836

[1]Herrera-Velázquez, C.H., [2]Ibarra-Wiley, R., [3]Trejo-Narvaez, N., y [3*]Herrera-Larrasilla, T.E. INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PROTOTIPO FUNCIONAL DE MEMBRANAS DE QUITOSAN CON MICROCÁPSULAS DE TRICLOSAN PARA EL TRATAMIENTO DE LA PERIODONTITIS CRÓNICA. 842

QUÍMICA FARMACOBIOLÓGICA

[1,2]López-Pablos, A.L., [1]Silva-Cázares, M.B., [3]López-Martínez, L.A., [3]Martínez-Juárez, L.G., [4]Leyva-Porras, C.C., y [1]*Saavedra-Leos, M.Z. CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y TÉRMICA DE DOS POLIMORFOS DE LA LACTOSA Y LA COMPARACIÓN DE SUS PROPIEDADES PARA SU USO COMO EXCIPIENTES. 846

[1]Calderón-Guzmán, D., [2]Ortiz-Herrera, M., [1]Osnaya-Brizuela, N., [1]Barragán-Mejía, G., [3]Juárez-Olguín, H., [3]Hernández-García, E. y [1] Valenzuela-Peraza, A. TRACE ELEMENTS USED IN PATIENTS MAY CAUSE OXIDATIVE DAMAGE IN BRAIN OF RATS WITH HYPOTENSION INDUCED. 859

[1]Hernández-Gómez, K.A., [2]Valadez-Vega, M.C., [2]Cruz-Castañeda, A., [2]Izquierdo-Vega, J.A., y [2]Sánchez-Gutiérrez, M. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE HOJA DE *Gnaphalium viscosum* (Kunth), SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA. 860

[1*]Torres-Figueroa, A.V., [1]Pérez-Martínez, C.J., [2]Del Castillo-Castro, T., [1]Corella-Madueño, M.A.G. y [1]Bolado-Martínez, E. LIBERACIÓN CONTROLADA DE AMOXICILINA A PARTIR DE HIDROGELES POLÍMERICOS. 867

[1,2]López-Pablos, A.L., [1]Silva-Cázares, M.B., [3]López-Martínez, L.A., [3]Martínez-Juárez, L.G., [4]Leyva-Porras, C.C., y [1]*Saavedra-Leos, M.Z. MODIFICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA YA EXISTENTE DE OBTENCIÓN DE B-LACTOSA PARA AUMENTAR SU GRADO DE PUREZA..... 868

[1]Vargas-Amado, M.E., [2]Barragán-Martínez, Z., [3]Carrasco-Alcántara, D., [1]*Álvarez-Maya, I. DISTRIBUCION ESPACIAL DE CASOS DE DIABETES MELLITUS EN EL ESTADO DE COLIMA DURANTE EL 2016. 879

[1,2]García-Alegría, A.M., [3]Gómez-Álvarez, A., [4]Anduro-Corona, I., [5]Burgos-Hernández, A., [1,2]Ruiz-Bustos, E., [2]Cáñez-Carrasco, M.G., [5]Canett-Romero, R., y [1,2,4*]Astiazarán-García, H.F. INESTABILIDAD GENÓMICA EN RATAS SPRAGUE DAWLEY EXPUESTAS A ALUMINIO ($AlCl_3$). 889

[1]Villa-García-Torres, L.S., [1]González-Pelayo, G.L., [2]Escobar-Santibáñez, L.P., [1]Gaona-Bernal J., y [1]Marino-Marmolejo, E.N., [1*]Flores-Hernández, F.Y. AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL PROVENIENTES DE POBLACIÓN MEXICANA: PERSPECTIVAS EN EL DESARROLLO DE TERAPIA CELULAR. 900

Sánchez-Gómez, I., Villa-García-Torres, L.S., Bravo-Madrigal, J., Flores-Hernández, F.Y., *Marino-Marmolejo, E.N. EFECTO DE LA HESPERIDINA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL (CTMCU) A CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA (CPI). 909

[1]Avalos-Salgado, F.A., [1]Quiñones-Aguilar, E.E., [1,2]Enríquez-Vara, J.N., [1,2]Guízar-González, C., [1]*Rincón-Enríquez, G. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EN LA MULTIPLICACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO LÍTICO EN UN SISTEMA *in vitro*. 916

[1a]Maldonado-Becerril, M., [1b]Rodríguez-González, J.A., [1b]Camacho-Ruiz, R.M., [1a]Canales-Aguirre, A.A., [1a]Esquivel-Solís, H., [1a*]Márquez-Aguirre, A.L. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA DE UNA PROTEÍNA TERAPÉUTICA: ERITROPOYETINA RECOMBINANTE HUMANA (rHuEPO). 922

[1]Ayala-Hernández, B.L., [2]Gutiérrez-De-Velasco-Barrera, I.G., [3]Brito-Torres, A.E., [4]Armijo-Gómez, J.A., [5]Zavala-Aguirre, J.L., [6*]Torres- Bugarín, O. GENOTOXICIDAD DEL CIGARRO ELECTRÓNICO (14 MG DE NICOTINA) EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN: ESTUDIO PRELIMINAR. 931

[1]Zerecero-Núñez, J.A., [2]Navarrete-Manzo, M.C. EFECTO DE DIFERENTES TIPOS DE ONDAS ELÉCTRICAS EN LA RAPIDEZ DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE. 933

[1]Acevedo-Medrano, J.L., [2]Rubio-Arellano, E.D., [2]Fajardo-Robledo, N.S., [3*]Romero-Tejeda, E.M. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA EN PLASMA. 934

[1]Hernández-Sapiéns, M.A., [2]Cevallos-Ricardo, R., [1]Reza-Zaldívar, E.E., [1]Gutiérrez-Mercado, Y.K., [1]Márquez-Aguirre, A.L., [1]Esquivel-Solís, H., [1]Padilla-Camberos, E., [2]Gazarian, K., [1*]Canales-Aguirre, A. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER HEREDADA. 939

[1]Gutiérrez-Ortega, R.C., [1]Sánchez-Soto, J.E., [2]Gaona-Bernal, J., [1]Cárdenas-Vargas, A., [3]Absalón-Constantino, A.E., y [1]*Herrera-Rodríguez, S.E. VIRUS ONCOLÍTICO Y SU POTENCIAL TERAPÉUTICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA. 950

[1]Arias-Ruiz, L.F., [1]Landa-Saldaña, A., [1]Montes-Güitrón, J.A., [1]Brito-Torres, A.E., [2]Armijo-Gómez, J.A., [1]Molina-Noyola, L.D., [3]Zavala-Cerna, M. G., [3*]Torres-Bugarín, O. EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD DEL CIGARRO ELECTRÓNICO MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS Y OTRAS ANORMALIDADES NUCLEARES EN MUCOSA BUCAL. 961

[2*]Ruiz-Jiménez, L.F., [1]Duque, J.E., [2]Ortega-Boada, H. y [3]Sierra, D.A. DISEÑO DE UNA NARIZ ELECTRÓNICA CON CAPACIDAD DE RECONOCER VECTOR DEL MAL DE CHAGAS. 966

[1]Sánchez-Soto, J.E., [1]Gutiérrez-Ortega, R.V., [1]Cárdenas-Vargas, A., [1]Hernández-Gutiérrez, R., [2]Hernández-Alva, D.A., [3]Jiménez-Jiménez, M., [1]*Herrera-Rodríguez, S.E. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS EXOSOMALES POR INMUNOPROTEÓMICA COMO POSIBLES BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PRÓSTATA. 968

Pulido-Urbano, A.T., Guevara-Solis, G.E., Guitierrez-Saucedo, R.A., Martínez-Pérez, E.F., Mendizabal-Mijares, E. y *Figueroa-Ochoa, E.B. EVALUACION DEL PERFIL CINÉTICO DE LIBERACION DE FÁRMACOS ANTIMICOTICOS EN SOLUCION MICELAR DE COPOLÍMEROS TRIBLOQUE. 976

[1,2*]Peñaloza-Cabrera, A., [1,2]Gutiérrez-Reyna, A., Zamora-Pizano, L., [1]Montalbán-Huidobro, C., [2]Caspeta-Guadarrama, L., [2]Gutiérrez-Villafuerte, Ma. y [2]González-Morales, L. ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE SECRECIONES DE GLÁNDULAS PAROTIDAS DE ANUROS..... 977

[1*]Oaxaca-Camacho, A.R., [1]Hernández-Gutíerrez, R., [1]Ochoa-Mojica, O.R., y [2]López-Navarro, C.R. PARTÍCULAS MAGNÉTICAS USADAS PARA CAPTURAR DE MANERA EFICIENTE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA..... 979

[1]Pérez-Padilla, N.A., [1]Nuño-Ayala, A., [1]Nuño-Ayala, J.L., [1]Miranda-Astiazarán, E., [2]Licea-Navarro, A.F., y [1*]Lugo-Fabres, P.H. PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECCIÓN Y CONTROL DE BROTES DE INFLUENZA TIPO A (H5 Y H7) EN AVES DE GRANJA. 986

[1*]Lugo-Fabres, P.H., [1]Nuño-Ayala, A., [1]Pérez-Padilla, N.A., [1]Miranda-Astiazaran, E., [2]Licea-Navarro, A.F., y [1]Nuño-Ayala, J.L. DETECCIÓN IN SITU DE TUBERCULOSIS Y VIH MEDIANTE UNA NUEVA TECNOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO EN SUSTRATO SÓLIDO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS CON INTELIGENCIA ARTIFICIAL..... 991

[1]García-García, O.L., [2]Licea-Navarro, A., [3]Vallejo-Cardona, A.A., [3*]Camacho-Villegas, T. A. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD Y CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE UN ANTICUERPO DE DOMINIO SENCILLO CON USO TERAPEUTICO POTENCIAL. 998

[1]Burciaga-Flores, M., [1]Reza-Escobar, E., [2]Licea-Navarro, A., [3*]Camacho-Villegas, T. USO TERAPEUTICO DE UN ANTICUERPO vNAR CON CAPACIDAD DE RECONOCER A LA CITOCINA HUMANA TGF-β. 1011

Aguilera-Arana, M.A., Meza-Carmen, V., Nava-Barrios, L.M., [*]Ortiz-Alvarado, R. EFECTO DEL ACEITE DE SEMILLA DE *Prunus serotina var. capuli* en UN MODELO DE RATÓN DIABETICO. 1025

[1*]Pérez-Martínez, C.J., [1]Corella-Madueño, M.A.G., [1]Quizán-Plata, T., [1]Rascón-Careaga, A., [2]Alvarado-Esquivel, C., [3]Hernández-Tinoco, J., [3]Sánchez-Anguiano, L.F. SERO-EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR TOXOPLASMA GONDII EN DONADORES DE SANGRE DEL ESTADO DE SONORA. 1029

[1*]Vite-Mejía, F.J., y [1,2]Brena-Becerril, A. HOMOLOGÍA DE NRF2 HUMANA (FACTOR NUCLEAR-2, DERIVADO DE ERITROIDES 2) EN MAMÍFEROS SUPERIORES. [HOMOLOGY OF NRF2 HUMAN (NUCLEAR FACTOR-2, DERIVED FROM ERYTHROID 2) IN HIGHER MAMMALS]. 1034

[1]Miranda-Astiazarán, E., [1]Nuño-Ayala, J.L., [1]Perez-Padilla, N.A., [1]Nuño-Ayala, A., [2]Villafaña-Rojas, J., [3]Licea-Navarro, A.F., y [1*]Lugo-Fabres, P.H. ANÁLISIS DE TEMPERATURAS ÓPTIMAS DE EXPRESIÓN EN ESCHERICHIA COLI DE TRES CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS (VNAR/TB) PARA DIAGNOSTICOS IN SITU. 1042

[1*]Martínez-Baso, R.J., [2]Ríos, N. y [2]Montañez, D. POTENCIAL ANTIMICROBIANO COMBINADO DE EXTRACTOS DE TRES PLANTAS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN LA PIEL..... 1049

[1]*Corella-Madueño, M.A.G., [1]Rascón-Careaga, A., [1]Quizán-Plata, T., [1]Pérez-Martínez, C.J., [1]Zubiate-Cabanillas, G., [1]Lozano-Aviles, J.C., [2]Martínez-Robinson, K.G. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA DE ADULTOS SENSIBILIZADOS Y NO SENSIBILIZADOS DE LA CIUDAD DE HERMOSILLO, SONORA. 1050

Romero-Perez, L.G. y *Brena-Becerril, A. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LACTOFERRINA PARCIAL [*Homo sapiens*] (HUMANO) ACTUANDO COMO MECANISMO DE LA DEFENSA CONTRA BACTERIAS Y HONGOS..... 1059

Velázquez-Cortés, S.A. y *Brena-Becerril, A. HOMOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS EN ROEDORES. 1060

[2]Ramírez-Anguiano, A.C., [1*]Ramírez-Medina, J., [2]Salazar-Camarillo, V.M., [2]Velázquez-Juárez, G. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PRODUCIDA POR LA MICROBIOTA INTESTINAL AISLADA DEL ESCARABAJO *Ulomoides dermestoides* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GÉNEROS BACTERIANOS..... 1061

Villalobos-Ornelas, P.C., *Vizcaíno-Rodríguez, L.A., Luján-Godínez, R., y Caro-Becerra, J.L. SÍNTESIS *IN VITRO* DE MICROCISTINAS POR *Microcystis aeruginosa* AISLADA DE LA LAGUNA DE CAJITITLÁN. (*IN VITRO* MICROCYSTINS SYNTHESIS, FOR *Microcystis aeruginosa* ISOLATED FROM LAKE CAJITITLÁN)... 1068

Villalobos-Ornelas, P.C., *Vizcaíno-Rodríguez, L.A. y Brena-Becerril, A. RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL LA MICROCISTINA EN DIFERENTES ORGANISMOS PARA DETERMINAR SU PRESENCIA Y NIVEL DE TOXICIDAD. 1075

Flores- Kelly, J.M., Balderas- Hernández, V.E. y De-León-Rodríguez A. EFECTO DE FTALATOS EN LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL..... 1076

Balderas-Hernández, V.E., Zermeño-Pérez, D., y De-León-Rodríguez, A. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS (DERIVADOS DEL ÁCIDO FTÁLICO)..... 1078

Olvera-Mariscal, A.I. y Soto-Jauregui, P.Y. PROYECTO DE AUTOMATIZACIÓN DE FOTOTERAPIA. 1079

Jiménez-Mancilla, C. N., Oros-Zamora, E. F. y Olivos-Mondragón, A. A. BIOCHECK. 1080

Mondragón-Olivos, A.A. y Zerecero-Núñez, J.A. CPR MODE AUTOMATIZATION FOR AN INTENSIVE CARE UNIT. 1081

PRÓLOGO

Zapopan Jalisco a 27 noviembre de 2017

Estimados Congresistas:

La elaboración de este libro memorial de las actividades del "6to. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía", es un esfuerzo que los miembros del comité organizador han realizado en la búsqueda de perpetuar la gran participación que se tuvo en esta edición del 2017, de uno de los congresos de licenciatura y posgrado en el área de ciencias más importante de México organizado por una institución educativa. Este año cerca de 300 importantes contribuciones mostraron que los jóvenes estudiantes de pre-grado, así como de posgrado están involucrados con el desarrollo de investigación que se lleva a cabo en sus instituciones. El quehacer diario en los laboratorios investigación de estos muchachos enriquece a lo que llamamos "la cultura científica", tan necesaria e importante como los conocimientos adquiridos en las aulas.

El congreso, que inició en 2007 como un tímido proyecto en la mente de estudiantes y profesores con una participación de 650 asistentes, 10 años después es un importante proyecto de divulgación científica que privilegia las ideas y la innovación, creando una zona del conocimiento con sentido transformante, que ha logrado reunir a más de 1100 personas.

"Ciencias e Innovación para la Salud" fue la premisa de este evento, en el que participaron importantes conferencistas de todas las áreas de la biología, química y la agronomía y que bajo un contexto interdisciplinario logró reunir a 32 conferencista nacionales y extranjero, que aportaron a través de sus ponencias, propuestas y soluciones en materia de agricultura, alimentación, biotecnología, procesos químicos, salud y contaminación ambiental, así como en la restauración de los ecosistemas que en virtud de la actividad humana han sufrido deterioros severos.

En nombre del comité que presidimos, nos enorgullecemos en presentar a ustedes el libro de memorias de los trabajos libres presentados en el "6to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía" organizado por las Facultades de Ciencias Químicas y Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Disfruten de este gran esfuerzo y que el mismo sirva como una memoria activa y latente de la investigación que se realiza en la búsqueda de soluciones que México necesita, influyentes para una mejor calidad de vida y contribuyente al progreso tecnológico.

MSC Tomás Ornelas Salas
Presidente del Comité Organizador

MVZ Fernando Gabriel Cinco Castellanos
Vicepresidente del Comité Organizador

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

PRUEBA DE CONCEPTO DE UN POLINIZADOR AUTOMÁTICO DE LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) EN INVERNADERO.

[1]Barrera-Galván, T., [1]Rodríguez-Mendoza, R., [1]Bañuelos-Amezcua, U. y [1,2*]Oceguera-Contreras, E.

1. Facultad de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable. Instituto Tecnológico Superior de Jalisco, Mario Molina Pasquel y Henríquez, Unidad Académica Tamazula, Carretera Tamazula-Santa Rosa 329, C.P. 49650, Tamazula de Gordiano, Jalisco, México. Teléfono: +52(358)103 0060.
2. Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara.

*Autor para correspondencia: eden.oceguera@valles.udg.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La polinización suplementaria en la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) permite obtener frutos más grandes y de mayor calidad. Los sistemas tradicionales de polinización pueden ser manuales, abejorros (*Bombus terrestris*), polinizadores eléctricos y sopladores. Todos ellos aumentan la inversión de la producción. El objetivo de este estudio fue evaluar una prueba conceptual (polinizador automático, AP) y analizar su actividad como polinizador de la planta de tomate contra la polinización manual en invernadero. Se realizó un diseño experimental utilizando muestras independientes de igual tamaño, donde 20 plantas fueron completamente elegidas al azar para cada uno de los tratamientos. Establecimos 27 ° C como una temperatura de polinización óptima para la polinización de tomate bajo invernadero. En los primeros 150 días AP polinizó el 90% de las plantas frente al 75% del MP. Tanto la producción de tomate como los racimos por planta fueron mayores con la AP que con MP, con un total de 963 tomates (48,2 ± 14,6) vs 714 (35,7 ± 16,7) ($p < 0,5$) y 130 (6,5 ± 1,6) vs 108 (5,4 ± 1,5) ($p<0,05$) racimos por planta. La inversión de la construcción AP es más económica (5.4 veces) que la MP. En este estudio se ha demostrado la viabilidad de utilizar un robot para polinizar los tomates bajo invernadero. Se ha diseñado, desarrollado y probado con éxito una prueba de concepto de un polinizador automático.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*; cultivos protegidos; polinización suplementaria; prototipos.

REFERENCIAS

[1] Adams, S., Cockshull, K., Cave, C., 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. Annals of Botany, 88(5):869-877. Asociación Mexicana de Horticultura protegida, 2017. Disponible en: http://www.amhpac.org/es/index.php/homepage/agricultura-protegida-en-mexico

[2] Bulanon, D. M., Kataoka, T., 2010. Fruit detection system and an end effector for robotic harvesting of Fuji apples. Agricultural Engineering International: CIGR Journal, 12(1): 1-14.

[3] Coro-Arizmendi, M., 2009. La crisis de los polinizadores. CONABIO. Biodiversitas, 85: 1-5.

OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EN LA MULTIPLICACIÓN DEL BACTERIÓFAGO LÍTICO ΦXaF18 ASOCIADO A LA CEPA BV801 DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*.

[1]Ibarra-Rivera, G., [1]Quiñones-Aguilar, E., [1,2] Enríquez-Vara, J., [1]García-Márquez, E., [1,2]Guízar-González, C., y [1*]Rincón-Enríquez, G.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Biotecnología Vegetal, Zapopan, Jalisco, México.
2. CONACYT- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Biotecnología Vegetal, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: grincon@ciatej.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Los bacteriófagos representan una alternativa ecológica para el control de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas como *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav). El objetivo de este trabajo fue optimizar los parámetros de multiplicación del bacteriófago lítico ΦXaF18 en la cepa BV801 de Xav. Para ello se realizaron tres experimentos factoriales. En el primer experimento se evaluaron dos factores: A) fase de crecimiento bacteriano (latencia, exponencial y estacionaria); B) relación bacteria:bacteriófago (10:1, 1:1 y 1:10). El segundo experimento se evaluaron los factores: A) tiempo de incubación (24, 48 y 96 h); B) velocidad de agitación (50, 100 y 200 rpm). La variable que se cuantificó en todos los experimentos fue la concentración UFP/mL del bacteriófago. En el último experimento se evaluó la combinación de los cuatro factores con mayor título, con cinco repeticiones. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0.05$). Las condiciones óptimas para multiplicar al bacteriófago ΦXaF18 fueron durante la fase de latencia con una relación bacteria/bacteriófago de 1:1 a una velocidad de agitación de 200 rpm y en un tiempo de incubación de 96 h. Estas condiciones aseguran títulos virales de al menos $1x10^{10}$ bacteriófagos por mL de medio de cultivo.

Palabras clave: *Capsicum annuum L.; Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; control biológico, mancha bacteriana.

INTRODUCCIÓN

La mancha bacteriana ocasionada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) es una de las enfermedades más severas en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Esta enfermedad afecta tanto a follaje como a tallo, flores y fruto [1]. En México, el chile es de los cultivos más importantes y esta enfermedad se presenta comúnmente en diversas zonas productoras del país, afectando el rendimiento en la producción o incluso ocasionando la pérdida total del cultivo. Tradicionalmente el control de esta enfermedad es a través del uso de antibióticos agrícolas como son la oxitetraciclina y la estreptomicina, aunque también se han reportado el uso compuestos de cobre [2]. El uso excesivo de estos compuestos químicos ha generado el desarrollo de cepas multi-resistentes y el incremento en los costos de

producción del cultivo, además de contribuir significativamente con la contaminación del medio ambiente.

El desarrollo de métodos alternativos para el control de enfermedades en plantas es de gran importancia [1]. El control biológico de enfermedades en plantas es el uso de organismos o sus productos para el combate de problemas fitosanitarios provocados principalmente por bacterias, hongos y nematodos [3]. Los bacteriófagos también conocidos como fagos (virus de bacterias) son una atractiva herramienta para el control de enfermedades causadas por bacterias [4]. Diversos trabajos han reportado su efectividad como método de control biológico en una variedad de bacterias fitopatógenas, en las que principalmente destaca el género *Xanthomonas*. Los fagos son altamente específicos e inocuos para cualquier otro organismo vivo por lo cual tienen un gran potencial para remplazar las medidas de control químico [5]. En la actualidad la autoridad en medicamentos y alimentos (FDA) de Estados Unidos ha aprobado el uso de algunas formulaciones a base de bacteriófagos para productos alimenticios y aplicaciones medioambientales [6]. La primera compañía en producir comercialmente fagos para el control de bacterias fitopatógenas fue OmniLytics Inc. quienes lanzaron una línea de productos llamada "AgriPhage®" para prevenir enfermedades causadas por *Xanthomonas* spp. y *Pseudomonas*. spp. en los cultivos de chile y jitomate. La bioproducción de fagos es un proceso clave en el desarrollo de productos para la industria de la fagoterapia, especialmente en aplicaciones agrícolas dada la amplia población de bacterias que se tratan, así como la naturaleza de los sistemas "abiertos" en agricultura y donde el éxito de cualquier tratamiento de biocontrol depende de una alta concentración inicial del bacteriófago [7, 5]. Otro aspecto importante es la aplicación inadecuada de fagos, por ejemplo, se ha demostrado que a concentraciones bajas (10^6 Unidades Formadoras de Placa (UFP) mL^{-1}) en relación a una concentración alta de bacterias (10^8 UFC mL^{-1}) aumenta la frecuencia en el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los bacteriófagos [1]. Sin embargo, aumentar la concentración en las preparaciones fágicas requiere conocer las características y el ciclo de vida del fago [8]. Además, es importante elegir el título viral, el título bacteriano y el tiempo de inoculación del cultivo de bacterias [9]. La multiplicidad de infección (MOI) y/o el número de genomas virales que infecta una célula y la fase de crecimiento de la población bacteriana son condiciones importantes que pueden hacer variar el nivel de virulencia del fago [10]. En este estudio se determinaron las condiciones óptimas para la multiplicación *in vitro* del bacteriófago lítico ΦXaF18 en la cepa BV801 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacteriófago y cepa bacteriana

Se utilizaron el bacteriófago lítico ΦXaF18 y la cepa bacteriana BV801 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* de la colección de bacterias y bacteriófagos de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

Medios de cultivo microbiológicos

Medio de cultivo liquido NYG (0.3% de extracto de levadura, 0.5% peptona, 2.0% glicerol) cuando se requirió medio solido se agregó agar (1.4%) (NYGA) mientras que para el medio suave solo se agregó la mitad de agar (0.7%).

Multiplicación y titulación del bacteriófago

En matraces Erlenmeyer se adicionó medio NYG líquido y se inoculó con el bacteriófago y la bacteria, respectivamente. Los matraces se incubaron a 30°C en agitación constante. Una vez trascurrido el

periodo de incubación se centrifugó 20 min a 15000 rpm a 4°C, después se recuperó el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.22 µm. De las suspensiones enriquecidas con el bacteriófago se realizaron diluciones decimales hasta $1x10^{-9}$ y mediante el ensayo de doble capa se determinó la concentración del fago en Unidades Formadoras de Placa de lisis por unidad de volumen (UFP mL^{-1}).

Diseño experimental

Los tratamientos se distribuyeron en tres experimentos factoriales, en los primeros dos, con tres repeticiones por tratamiento. En el primer experimento se evaluaron nueve tratamientos resultado de la combinación de los niveles de dos factores: A) fase de crecimiento bacteriano con tres niveles [latencia (1 h después inoculación-hdi), exponencial (6 hdi) y estacionaria (10 hdi)]; B) relación bacteria:bacteriófago con tres niveles (10:1, 1:1 y 1:10). En el segundo experimento se evaluaron nueve tratamientos resultado de la combinación de los niveles de dos factores: A) tiempo de incubación con tres niveles (24, 48 y 96 h); B) velocidad de agitación con tres niveles (50, 100 y 200 rpm). La variable de respuesta evaluada cuantitativamente fue el título de bacteriófagos obtenido por diluciones seriales en doble placa. En el último experimento se evaluó la combinación de los cuatro factores con mayor título bacteriano, con 5 repeticiones.

Análisis estadístico

En cada experimento, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza y prueba múltiple de comparación de medias Tukey a un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0.05$) mediante el programa Statgraphics Centurión XV (2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo al primer experimento se procedió a determinar la curva de crecimiento de la cepa BV801 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* en el medio de cultivo NYG. Con lo cual se obtuvieron los tiempos adecuados para la inoculación del fago en cada una de las fases de crecimiento (latencia: 1 hora, exponencial: 6 horas y estacionaria: 12 horas). Para la relación bacteria/bacteriófago los inóculos correspondientes se ajustaron a una concentración representada en unidades formadoras de colonias/unidades formadoras de placas, respectivamente.

La fase de latencia bacteriana es significativamente sensible a la infección viral

Los tratamientos se sometieron a una velocidad de agitación de 200 rpm a 24 h de incubación. Posteriormente se obtuvieron los títulos virales. Los resultados mostraron que con el tratamiento (fase de latencia con una relación 1:1 de bacteria:bacteriófago= Xav:ΦXaF18) se tuvieron títulos significativamente superiores ($p \leq 0.05$) de 7.9 E+9 UFP (unidades formadoras de placa) mL^{-1} (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comportamiento de la multiplicación del bacteriófago ΦXaF18 en la cepa BV801 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria.*

Tratamiento	**Descripción**	**Concentración viral en UFP mL^{-1} (1×10^{8})**
Fase de crecimiento bacteriano y relación bacteria:bacteriófago	Fase de latencia con relación 1:1	340*
Tiempo de incubación y velocidad de agitación	96 h de incubación a 200 rpm	5300*
Fase de crecimiento bacteriano,	Fase de latencia con	840*

relación bacteria:bacteriófago, tiempo de incubación y velocidad de agitación	relación 1:1, 96 h de incubación a 200 rpm

*Estos tratamientos fueron estadísticamente significativos de acuerdo a la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

La interacción bacteria:virus requiere alta oxigenación y tiempo de incubación

A partir de los resultados obtenidos del primer experimento se consideró (fase latencia con una relación bacteria/bacteriófago 1:1) para la inoculación del fago en los tratamientos del segundo experimento en el cual los parámetros evaluados fueron el tiempo de incubación y la velocidad de agitación. En el Cuadro 1 se observa los resultados obtenidos del segundo experimento. El tratamiento de 96 h de incubación a 200 rpm mostró un título significativamente superior ($p \leq 0.05$) de 5.3×10^{11} UFP mL^{-1} en comparación con los demás tratamientos.

Comportamiento de la interacción bacteria:virus para obtener altos títulos virales

En el tercer experimento se comprobó que la inoculación de fase de latencia; relación 1:1 de BV801:ΦXaF18; a 200 rpm y con 96 h de incubación se encontraron títulos virales de 8.4×10^{10} UFP mL^{-1} (Cuadro 1).

Debido a que los bacteriófagos líticos utilizan la maquinaria celular de la célula hospedera para replicarse y ensamblarse, pueden ser más eficaces en poblaciones bacterianas en fase exponencial [7]. En este trabajo la evaluación de la fase de crecimiento contrasta con lo antes mencionado ya que la fase de latencia durante el primer experimento mostró títulos virales más altos en comparación con las otras fases de crecimiento bacteriano, por tanto, para validar estos resultados en estudios posteriores se recomienda considerar un mayor número de repeticiones.

En cuanto al tiempo de incubación, el óptimo se obtuvo a las 96 horas alcanzando una concentración viral más alta. En 1997 Schrader y colaboradores realizaron un estudio en el cual demostraron que algunos fagos pueden infectar a células bacterianas incluso en fase estacionaria [11]. Con base en esto, los resultados obtenidos podrían indicar que el fago ΦXaF18 continúa infectando a las células huésped después de que estás llegan a la fase estacionaria, causa por la cual se incrementaría la concentración final.

En la velocidad de agitación se observó que a mayor velocidad hubo un incremento en los títulos virales. Esto podría deberse a que el proceso de adsorción del fago a la célula huésped es el resultado de una colisión aleatoria ya que el fago no cuenta con estructuras especializadas que le permitan desplazarse [4]. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de viriones y de células bacterianas, el número de colisiones aleatorias aumenta a una mayor tasa de adsorción [4]. En condiciones *in vitro* la velocidad de agitación juega un papel crucial para aumentar la probabilidad de infección del virus.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se determinó que las condiciones óptimas para multiplicar al bacteriófago ΦXaF18 en la cepa BV801 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* fue durante la fase de latencia con una relación bacteria/bacteriófago de 1:1 a una velocidad de agitación de 200 rpm y en un tiempo de incubación de 96 horas. Estas condiciones aseguran títulos virales de al menos 1×10^{10} mL^{-1}.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de este trabajo como parte del proyecto "Nanobiocontrol inteligente de

bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas*) de solanáceas de importancia agrícola en México" de la convocatoria: Atención a Problemas Nacionales (2015) (Clave CONACyT: 2015-01-338).

REFERENCIAS

[1] T. Sadunishvili, E. Kvesitadze, and G. Kvesitadze, "*Xanthomonas vesicatoria* specific virus and its potential to prevent tomato bacterial spot disease," in Nanotechnology to Aid Chemical and Biological Defense, T. A. Camesano, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015, pp. 35–47.

[2] F. B. Iriarte, A. Obradović, M. H. Wernsing, L. E. Jackson, B. Balogh, J. A. Hong, M. T. Momol, J. B. Jones, and G. E. Vallad, "Soil-based systemic delivery and phyllosphere *in vivo* propagation of bacteriophages," Bacteriophage, vol. 2, no. 4, pp. 214–224, 2012.

[3] G. Rincón-Enríquez, L. López-Pérez, and E. E. Quiñones-Aguilar, "Efectividad biológica *in vitro* de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol," Rev. Fitotec. Mex., vol. 37, no. 3, pp. 229–234, 2014.

[4] D. V Rakhuba, E. I. Kolomiets, E. S. Dey, and G. I. Novik, "Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell," Polish J. Microbiol., vol. 59, no. 3, pp. 145–155, 2010.

[5] J. B. Jones, L. E. Jackson, B. Balogh, A. Obradovic, F. B. Iriarte, and M. T. Momol, "Bacteriophages for plant disease control," Annu. Rev. Phytopathol, vol. 45, pp. 245–262, 2007.

[6] S. A. A. Jassim and R. G. Limoges, "Natural solution to antibiotic resistance : bacteriophages 'The living drugs,' World J Microbiol Biotechnol, vol. 30, no. 8, pp. 2153–2170, 2014.

[7] J. J. Gill and P. Hyman, "Phage choice, isolation and preparation for phage therapy," Curr. Pharm. Biotechnol., vol. 11, pp. 2–14, 2010.

[8] R. A. Frampton, A. R. Pitman, and P. C. Fineran, "Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens," Int. J. Microbiol., vol. 2012, pp. 1–11, 2012.

[9] B. Szermer-olearnik and J. Boraty, "The kinetics of *Escherichia coli* B growth and bacteriophage T4 multiplication in SM-1 novel minimal culture medium," J. Gen. Appl. Microbiol., vol. 81, pp. 75–81, 2015.

[10] Z. Drulis-kawa, G. Majkowska-skrobek, B. Maciejewska, A. Delattre, and R. Lavigne, "Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications," Curr. Protein Pept. Sci., vol. 13, pp. 699–722, 2012.

[11] H. S. Schrader, J. Schrader, J. J. Walker, T. A. Wolf, K. W. Nickerson, and T. A. Kokjohn, "Bacteriophage infection and multiplication occur in *Pseudomonas aeruginosa* starved for 5 years," Can. J. Microbiol., vol. 43, pp. 1157–1163, 1997.

EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS EN LA TEMPORADA DE ESTIAJE-LLUVIAS DE LA LAGUNA DE COYUCA DE BENÍTEZ, ESTADO DE GUERRERO, MÉXICO.

*Sainz-Moreno, M.E., Arcos-Ramos, R., y Reyes-Cardozo, J.

UNAM, FES Zaragoza, Batalla 5 de Mayo S/N. Col. Ejército de Oriente. Del. Iztapalapa, México, D.F. cp. 09230.

*Autor para correspondencia: msmariobros208@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El trabajo consistió en evaluar algunas de las variables (parámetros físicos y químicos) del agua de la laguna de Coyuca de Benítez, Estado de Guerrero, México, en épocas de estiaje y lluvias durante el periodo de Marzo-Septiembre del 2016, se eligieron cinco puntos de monitoreo ubicados a lo largo laguna determinándose *in situ* variables físicas y químicas en el laboratorio. Algunos parámetros como temperatura, potencial de hidrógeno, salinidad, demanda bioquímica de oxígeno y demanda química de oxígeno mostraron diferencias significativas entre las épocas de estiaje y lluvias e igualmente los sitios muestreados presentaron diferencias ($P<0.05$KW) y a estos se les aplico la prueba de conglomerados para conocer los sitios con mayor similitud en cuanto a los parámetros evaluados. Los parámetros que obtuvieron mayores promedios en temporada de estiaje fue la temperatura, potencial de hidrógeno y potencial oxido reducción, en lluvias transparencia, profundidad, dióxido de carbono, sólidos totales disueltos, demanda química de oxígeno y demanda bioquímica de oxígeno, en relación a los sitios Estero Comboy Centro y Las Luces, Entrada al Río con La Barra presentaron similitud en los parámetros evaluados, con lo anterior se concluye el comportamiento hidrológico está relacionado a las variaciones de le temporada de estiaje y lluvias.

Palabras clave: Parámetros físicos y químicos; análisis de conglomerados; Laguna de Coyuca de Benítez; prueba de Kruskal-Wallis (KW).

INTRODUCCIÓN

El territorio mexicano tiene una extensión de 1 964 375 Km^2, de los cuales 1 959 248 Km^2, corresponden a superficie continental y 5 127 Km^2 son islas [1]. La zona costera mexicana es el espacio geográfico de interacción del medio acuático, el terrestre y la atmósfera está constituida por una porción continental definida por 263 municipios costeros, 150 con frente de playa y 113 interiores adyacentes a estos [1].

Según Kjerfue (1994) [2], las lagunas costeras son consideradas depresiones someras (<10m), con su eje principal paralelo a la costa, conectada al mar temporal o permanentemente por uno o más canales y separada de el por una barrera física, en tanto las lagunas costeras mexicanas varían ampliamente en sus características físicas, ambientales, el grado de uso y modificación por el hombres [3]. Tanto las lagunas costeras y estuarios se ubican entre los sistemas de mayor productividad, esto de pende de muchos factores que se ven modificados por los aportes fluviales y los intercambios mareales que alternan su dominancia en función de las principales épocas climáticas que se presentan a lo largo del año [4].

Las propiedades físico y químicas están influenciadas por la mezcla de aguas que fluctúan en tiempo y espacio ya que estas influyen en los cambios estacionales de estas variables [2], estos atributos son el resultado de la ubicación latitudinal; desde tropical, subtropical hasta templado, con climas distintos, catalogados como épocas de estiaje (primavera), lluvias (verano-otoño) y nortes (invierno) [5], debido a esto las características hidrológicas y ecológicas, las lagunas costeras muestran variaciones temporales de forma muy significativa [3].

La Laguna de Coyuca de Benítez, es un cuerpo de agua somero de volumen variable, dependiente de las épocas de estiaje y lluvias, se extiende paralelamente al litoral del Pacífico cerca de la bahía de Acapulco, tiene una desembocadura al oeste por un canal meándrico de aguas salinas y abundante en peces, el cual está separado del mar por una Barra Coyuca, es un sitio de alta biodiversidad [6]. La principal fuente de contaminación es por descargas residuales de origen doméstico provenientes del Río Coyuca y Conchero, infiltración de materia orgánica, mediante fosas sépticas y descargas generadas por comercios, restaurantes y otros servicios generados por influencia antropogénica [7].

La Laguna de Coyuca de Benítez ha sido estudiada en cuanto a los parámetros físicos y químicos, los más representativos han sido el realizado por Dios Diego en 2012 [12] y Cruz en el 2013 [6], reportaron algunos parámetros físicos y químicos coincidiendo en los promedios máximos en épocas de estiaje fue la profundidad, transparencia, temperatura, pH, CE, salinidad y en lluvias los STD, OD, DQO y DBO_5 (Cuadro 1).

En este trabajo se evaluaron algunas de las variables (parámetros físicos y químicos) del agua de la Laguna de Coyuca de Benítez, Estado de Guerrero, México, en épocas de estiaje y lluvias, durante los meses de Marzo a Septiembre del 2016, con el objetivo de conocer el comportamiento hidrológico de la Laguna.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La Laguna de Coyuca de Benítez se localiza en las costas del Pacífico Mexicano, en el estado de Guerrero al noroeste de Acapulco, entre los 16º 54' y 16º 58' de latitud norte y los 99º 57' y 100º 04' de longitud oeste. Cuenta con una superficie de 34Km^2, una longitud máxima de 10.6Km, una anchura promedio de 2.78Km y una línea de costa de 26Km. Contiene dos pequeñas islas: La Montosa y La Pelona. La laguna se abre al mar a través de un canal meándrico, lo cual le proporciona una dimensión especial [8], (Fig.1).
En su porción occidental la cuenca recibe los aportes del Río Coyuca que proviene de las montañas, el cual une con el arroyo de las Cruces en el lugar donde se abre la barra, también recibe las aguas del Río Conchero ubicado en la parte sur oriental, es somera con una profundidad promedio de 13-17m, de turbiedad regular en el canal meándrico, con transparencia media de 0.60m [8]. El clima de la región es de Aw1 (w) iw" cálido-subhumedo, con temperatura media anual de 29ºC y una precipitación total anual entre 15-235mm [9]. Las épocas climáticas características de región: estiaje, se extiende de Noviembre a Mayo y de lluvias que comprende los meses de Junio a Octubre [10].

Procedimiento de Campo

Se realizaron muestreos mensuales durante los meses de Marzo a Septiembre del 2016, en cinco sitios de muestreo a lo largo de la laguna: (A) Embarcadero Lag. De Coyuca, (B) Estero Comboy Centro, (C) Las

Luces, (D) Entrada al Río y (E) La Barra. En cada sitio se midieron los parámetros físicos y químicos, profundidad (m), transparencia (m), potencial de hidrógeno, conductividad eléctrica (CE) (µs/cm), salinidad (sal.) (‰), sólidos totales disueltos (STD) (mg L^{-1}), oxígeno disuelto (OD) (mg L^{-1}), bióxido de carbono (CO_2) (mgCO_2 L^{-1}), demanda química de oxígeno (DQO) (mg L^{-1}), y demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) (mg L^{-1}).

Las mediciones de las variables se realizaron *in situ*, durante el día entre las 8:00 y las 11:00am h. tanto en superficie y fondo, usando el multiparamétrico HANNA HI9828 previamente calibrado, el OD se midió utilizando el medidor de Oxígeno Disuelto HI9146, la profundidad y la transparencia con el disco de Secchi, en el laboratorio se determinaron DQO (Reflujo Cerrado), DBO_5 (Dilución) y CO_2 (Alcalinidad), se realizaron 2 repeticiones para cada variable en todos los sitios.

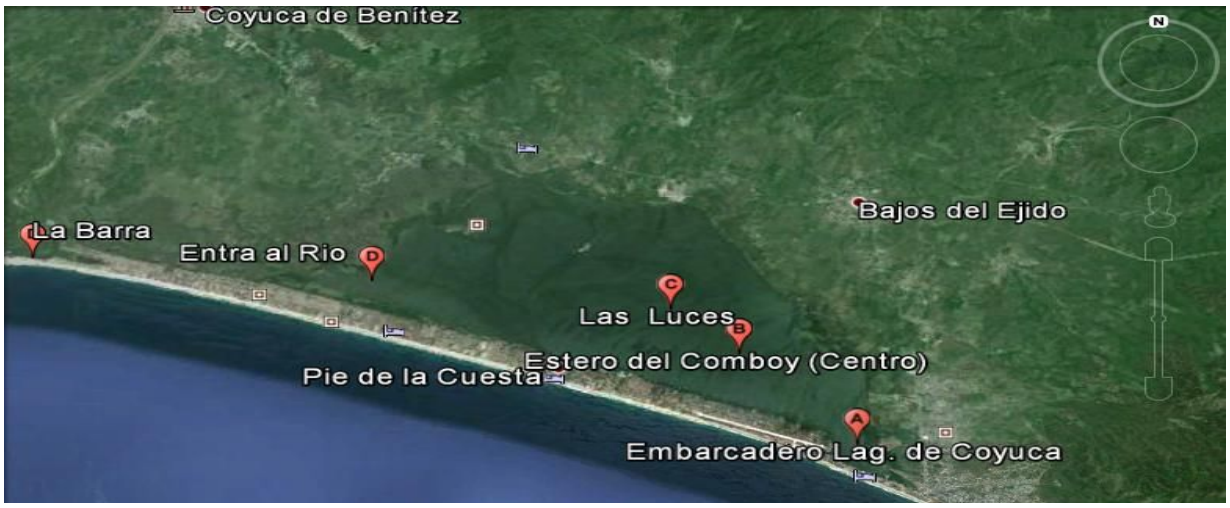


Figura 1. Laguna de Coyuca de Benítez, con los puntos de muestreo seleccionados que tienen influencia antropogénica. Escala: 1:10,000. INEGI, 2016.

Análisis Estadístico

Para analizar el comportamiento de los parámetros físicos y químicos se les aplico la Prueba de Kolmorogov-Smirnov a fin de conocer su normalidad, los resultados mostraron que los datos tienen un comportamiento no normal, por lo que se les aplico la prueba Kruskal-Wallis (KW), la cual compara las medianas dentro de cada una de las columnas es la misma, esto para saber si existía diferencias significativas a los grupos datos de cada parámetro por sitio y mes [11], se le aplico el programa Stargraphics Centurión XV.I.

Respecto a los sitios se le aplico la prueba de Conglomerados esto para conocer los grupos con mayor similitud en tanto a parámetros físicos y químicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables físicas y químicas

De manera en general algunas de las variables físicas y químicas como temperatura, pH, CE, DBO_5 y salinidad mostraron datos heterogéneos ($P<0.05$KW), entre la temporada de estiaje y lluvias, a diferencia

con los demás parámetros como la profundidad, transparencia, STD, OD, CO_2, y DQO mostraron datos homogéneos (P≥0.05KW) (Cuadro 2). En cuanto a los sitios existió diferencia significativa (P<0.05KW), lo cual indica que los parámetros evaluados no se comportaron igual en estos sitios (Cuadro 3).

Los parámetros que presentaron máximos promedios en temporadas de estiaje fueron la temperatura (29.88ºC), pH (8.32), OD (5.29mg L^{-1}) y salinidad (2.99‰), a diferencia de las otras variables que presentan máximos promedios en épocas de lluvias profundidad (6.65m), transparencia (0.52m), CE (3.65µs/cm), STD (2.3993 mg L^{-1}), CO_2 (mgCO_2 L^{-1}), DQO (80.37 mg L^{-1}) y DBO_5 (58.39 mg L^{-1}) (Cuadro 4). Los parámetros físicos y químicos evaluados en la Laguna de Coyuca de Benítez, durante dos épocas climáticas (estiaje y lluvias) durante Marzo a Septiembre del 2016, varios parámetros evaluados coinciden con los valores obtenidos con los obtenidos por Dios Karen (2012), Cruz Martín (2013) y con los obtenidos por De la Lanza (1998) [13], sobre que estos parámetros presentan variaciones con respecto a las fluctuaciones climáticas estacionales.

La temperatura de la laguna mostró datos heterogéneos (P<0.05KW) entre la temporada de estiaje y lluvias, coincide con el tipo de clima presente en este sistema que es Aw-cálido subhumedo, donde la temperatura promedio tiene un rango de 25-28ºC [14], el promedio presente en época de estiaje fue de 29.88 y en lluvias 28.76ºC respectivamente, coincidiendo con las obtenidas por Dios (2012) de 28.9±2.0 y Cruz (2013) de 28.21ºC. Esto se debió a que la temperatura está influenciada por las condiciones ambientales de la zona y a la incidencia de la luz solar, ya que la energía luminosa es absorbida exponencialmente con respecto a la profundidad [15], según López [16], las fluctuaciones moderadas de la temperatura en los ecosistemas tropicales, proporcionan un entorno favorable para la reproducción conservación de una gran variedad de organismos.

El promedio general del pH fue de 7.95±0.5 coincidiendo al registrado por Ferrera en el 2006 de 8.15 y por debajo con el de Dios (2012) de 8.73 y Cruz (2013) de 8.4±0.7, lo cual dice que el agua de la laguna tiende a ser ligeramente alcalina (7.1-8.0) [16], el cual indica que el sistema de amortiguamiento es denominado por los bicarbonatos (HCO_3^{-2}) y ligeramente por el CO_2 y no hay presencia de carbonatos [5], en el periodo de estiaje presentó un promedio mayor de 8.32 unidades y en lluvias de 7.68 unidades, debido a la aportación de las aguas del Río Coyuca y del Conchero, los cuales por el movimiento de tipo de flujo turbulento, esto provoca la remoción de los sedimentos provocando remineralización y por efecto de mar de fondo, ocasionando dilución entre el agua de mar y el agua dulce de la laguna afectando al pH [17].

La conductividad eléctrica presentó un promedio general de 3.45µs/cm, el mayor promedio se dio en época de lluvias con 3.68µs/cm a comparación en época de estiaje fue de 3.23µs/cm, al contrario al obtenido por Dios (2012) y Cruz (2013), sus mayores promedios se presentaron en épocas de estiaje con 2.46 y 2.1±0.5µs/cm respectivamente valores por debajo al obtenido en este trabajo, esto sucede por la hidrodinámica presente en la zona del canal de la laguna y a la heterogeneidad del sedimento a lo largo de este sistema y también a las descargas de aguas de origen doméstico y comercial, las partículas de estas se sedimentan y debido a la circulación del agua estas partículas de estas se sedimentan y debido a la circulación del agua sufren de una resuspensión en el sistema [18].

Cuadro 1. Comparativos de las variables físico y químicas de la Laguna de Coyuca de Benítez, Guerrero.

Parámetros físicos y químicos.	Karen de Dios,2012		Martín Cruz, 2013		Mario, 2016	
	Promedios: estiaje O lluvias X					
Profundidad (m)	2.5±0.8	O	3.12	O	4.64	X
Transparencia (m)	0.59±0.3	O	0.49	O	0.47	X
Temperatura (ºC)	28.9±2.0	O	28.21	O	29.40	O
pH unidades	8.4±0.7	O	8.73	O	7.95	O
CE (µs/cm)	2.1±0.5	O	2.46	O	3.53	X
Salinidad (‰)			1.29	O	2.50	O
STD (mg L^{-1})			1233.96	X	1711.47	X
OD (mg L^{-1})	5.2±1.5	X	5.53	X	5.10	O
CO_2 (mgCO_2 L^{-1})					1.6	X
DQO (mg L^{-1})	154.6±65	X	95.79	X	74.94	X
DBO_5 (mg L^{-1})	82.4±33.6	X	74.12	X	50.59	X

Cuadro 2. Prueba Kruskall-Wallis (KW) de los parámetros físico y químicos en temporada de estiaje y lluvias, datos homogéneos (P≥0.05KW) y heterogéneos (P<0.05KW).

Parámetros físicos y químicos.	Estiaje	Lluvias
Profundidad (m)	P>0.7673	P>0.8393
Transparencia (m)	P>0.3101	P>0.1817
Temperatura (ºC)	P<0.0088	P<0.0076
pH unidades	P<0.0306	P<0.0239
CE (µs/cm)	P<0.0400	P<0.0379
Salinidad (‰)	P<0.0461	P<0.0293
STD (mg L^{-1})	P>0.2545	P>0.4478
OD (mg L^{-1})	P>0.2916	P>0.4716
CO_2 (mgCO_2 L^{-1})	P>0.5125	P>0.3794
DQO (mg L^{-1})	P>0.0778	P>0.0973
DBO_5 (mg L^{-1})	P<0.0003	P<0.0002

Cuadro 3. Prueba Kruskall-Wallis (KW), de los sitios de muestreo en la Laguna de Coyuca de Benítez, Guerrero, datos homogéneos (P≥0.05KW) y heterogéneos (P<0.05KW).

Sitios	Temporada	
	Estiaje	Lluvias
Embarcadero. Lag de Coy.	P<0.0006	P<0.0009
Estero Comboy Centro	P<0.04415	P<0.0238
Las Luces	P<0.0118	P<0.0036
Entrada al Río	P<0.0003	P<0.0017
La Barra	P<0.0018	P<0.0096

Cuadro 4. Promedios máximos de los parámetros físicos y químicos, en temporada de estiaje y lluvias, en la Laguna de Coyuca de Benítez, Guerrero.

Parámetro	Época Climática			
	Estiaje		Lluvias	
	Promedios			
Profundidad (m)	4.18		6.65	X
Transparencia (m)	0.42		0.52	X
Temperatura (ºC)	29.88	X	28.76	
pH unidades	8.32	X	7.68	
CE (µs/cm)	3.23		3.68	X
Salinidad (‰)	2.99	X	2.86	
STD (mg L^{-1})	2.0934		2.39	X
OD (mg L^{-1})	5.29	X	4.95	
CO_2 (mgCO_2 L^{-1})	1.60		1.75	X
DQO (mg L^{-1})	68.66		80.37	X
DBO_5 (mg L^{-1})	40.21		58.39	X

El promedio general de DBO_5 fue de 50.9mgL^{-1}, en temporada de lluvias presentó el mayor promedio con 58.39mg L^{-1}, al contrario de épocas de estiaje fue de 40.21mg L^{-1}, coincidiendo con el obtenido por Dios (2012) y Cruz (2013) con 74.12 y 82.4±33.6mg L^{1} respectivamente, siendo el mayor en temporada de lluvias, esto se debió a la oxigenación que presento el sistema favorecido por las fuertes lluvias y por un fenómeno natural "mar de fondo", lo que hizo el incremento de materia orgánica y desechos domésticos provenientes de los Ríos Coyuca y el Conchero siendo depositados en la laguna [18].

La salinidad mostró diferencia entre las temporadas climáticas, indicando la influencia de las entradas de agua dulce, proveniente de los ríos principalmente el Coyuca y el Conchero, la apertura de la Barra y las precipitaciones lo cual hizo que la salinidad disminuyera en épocas de lluvias con 2.86‰ al contrario a la presente en épocas de estiaje con 3.00‰, esto debido a que la barra de Coyuca estuvo cerrada y no hubo influencia de agua mar lo cual no existió combinación de agua salada y agua dulce, lo cual disminuye la salinidad en esta época, el promedio general fue de 2.92‰, por encima del registrado por Dios (2012) de 1.29‰, esto se debió a que en los últimos años las precipitaciones aumentaron en la zona del Pacífico por lo que salinidad aumento [18]-[19].

Los resultados obtenidos para los parámetros físicos y químicos en relación con las temporadas climáticas se puede decir que está influenciado por la mezcla de aguas oceánicas y dulceacuícolas, en la zona del canal meándrico de la Laguna de Coyuca de Benítez, así como la ubicación de esta zona de estudio, se establecen 2 zonas climáticas de estiaje (noviembre a mayo) y lluvias (junio a octubre).

Los sitios mostraron diferencias significativas ($P<0.05$KW) por lo que se dice los parámetros evaluados no se comportaron de manera idéntica en los cinco sitios de muestreo. La prueba de conglomerados (Fig.2), demostró que los cinco sitios de muestreo se agrupan en un solo conglomerado pero los organiza en 2 grupos, Estero Comboy Centro con Las Luces y La Entrada al Río con La Barra, esto dice que los

parámetros físicos y químicos evaluados en épocas de estiaje y lluvias, se comportaron de manera similar en estos sitios, ya que el primer grupo pertenece a la zona Noroeste y Centro de la laguna y el segundo grupo corresponde al canal meándrico (zona Oeste), ya que este hace que la laguna se al mar y le proporcione una dimensión especial [6], solamente el Embarcadero Coyuca los parámetros se comportaron distintos a los demás sitios.

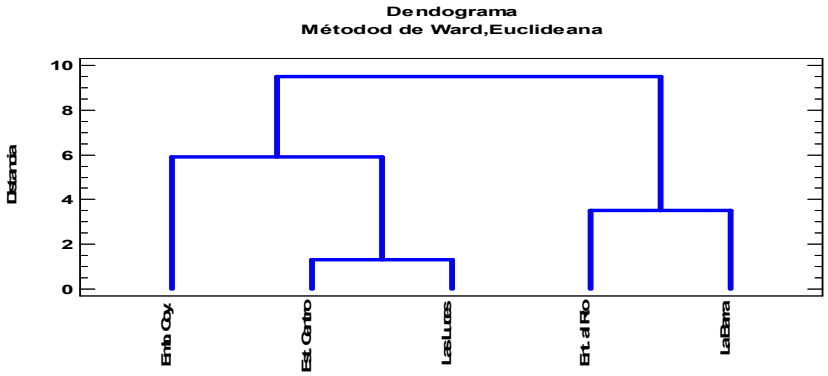


Fig. 2. Diagrama de Análisis de Conglomerados de los Sitios.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos de las variables físicas y químicas de la Laguna de Coyuca de Benítez, Guerrero, presentó diferencias significativas en relación a los parámetros evaluados en las épocas climáticas lo que marca dos estaciones climáticas en este sitio (estiaje y lluvias), en estiaje presentaron los mayores promedios la temperatura, pH, salinidad, y el oxígeno disuelto al contrario con los presentes en el periodo de lluvias fueron profundidad, transparencia, CE, STD, CO_2, DQO y DBO_5.

Con respecto a los sitios de muestreo, el análisis de conglomerados demostró que los sitios se agrupan en 2 conjuntos, Estero Comboy Centro con las Luces y La Entrada al Río con La Barra, en estos sitios los parámetros tuvieron un comportamiento similar en las épocas climáticas estudiadas.

REFERENCIAS

[1] J. Lara, Los Ecosistemas Costeros Insulares y Epicontinentales en capital natural de México, Conocimiento actual de la Biodiversidad. México: CONABIO, vol.1.pp.109-134, 2008.

[2] B. Kjerfue, Coastal Lagoon Processes. New York: Elsevier. P.577.1994.

[3] F. Contreras, L.O. Castañeda, E. Barbará-Macías, y H. M. Pérez, Caracterización e importancia de las Lagunas Costeras. Veracruz, México: Ed. CRIP/IPN/SAC, ARPA, pp.31-43, 2002.

[4] M.F.J. Gutiérrez, F. Varona, y F. Contreras, "Caracterización estacional de las condiciones físico-químicas y de productividad primaria fitoplanctónica de las lagunas costeras del Estado de Chiapas", Hidrobiología, vol. 2, no. 16, pp. 137-146, 2006.

[5] G. De la Lanza Espino, y J.C. Gómez Rojas, "Caracterización físicas y químicas del Golfo de México", Harte Research, Institute for Golf of Mexico studies., vol.1, pp.105-135, 2004.

[6] M. Cruz, "Calidad del agua en la Laguna de Coyuca de Guerrero y Geovisualizacion de los paisajes asociados", Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM, CDMX, México, 2013.

[7] POET, Programa de Ordenamiento Ecológico y Territorial del Municipio de Coyuca de Benítez, Guerrero, México: Espacio Urbano y Arquitectura, 2009.

[8] R.Gómez, "Caracterización óptica de la Laguna Costera de Coyuca de Benítez", Boletín del Instituto de Geografía. UNAM., no.16, pp.78-97, 2001.

[9] F.Contreras, y O. Castañeda, "La Biodiversidad de las Lagunas Costeras", Rev. Ciencias., no.76, pp.46-54, 2004.

[10] R. Aguirre, "Caracterización óptica de la Laguna Costera de Coyuca de Benítez", Boletín del Instituto de Geografía. UNAM., no.47, pp.79-90, 2001.

[11] S. Cervantes, G. Márquez, A. Rivera, Análisis Estadístico un Enfoque práctico con Stathgraphics. CDMX, México: Ed. UNAM, 2006.

[12] K. De Dios, "Índice de Saprobiedad como indicador de la calidad del agua en la Laguna de Coyuca de Benítez", Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM, CDMX, México, 2017.

[13] G. De la Lanza Espino, N. Sánchez Santillán, y A. Esquivel Herrera, "Análisis temporal y espacial fisicoquímica de una laguna tropical a través del análisis multivariado", Hidrobiología., vol.2, no.8, pp.89-96, 1998.

[14] C. Tovilla, A. Mora, J. Rojas, y D. Velázquez, "Caracterización del sitio de manglar Coyuca-Mitla", en CONABIO. CDMX, México: CONABIO, 2009.

[15] J. Gómez, G. Blancas, E. Constanzo, y A. Cervantes, Análisis de Calidad de Aguas Naturales y Residuales con aplicación a la Microescala, FES-Zaragoza., CDMX, México, 2014.

[16] M. López, G. Pulido, A. Serrano, J. Gaitán, W. Monks, y M. López, "Evaluación de las variables fisicoquímicas del agua de la Laguna de Coyuca de Tampamachoco, Veracruz, México", Rev. Científica UDO Agrícola., vol. 3, no. 12, pp.713-719, 2012.

[17] J. Gómez, Manual de Análisis de Aguas Naturales y su Aplicación a la Microescala, FES-Zaragoza, UNAM, CDMX, México, 2011.

[18] G. Ferrera, P. Centéllanos, y M. Garza, "Variation of benthic heterophic bacteria community with different respiratory metabolism in Coyuca de Benitez Coastal Lagoon (Guerrero)", Rev. Biología Tropical., vol.1, no.55, pp.55. 157-169, 2007.

[19] (2015) CONAGUA, "Contaminación Acuática". Available: http://www.gob.mx/CONAGUA.

[20] (2005) INEGI, "Cuéntame información por entidad y mapas". Available: http://cuentame.inegiorg.mx/monografias/informacion/gro/territorio/defaut.

CONTROL DE CENICILLA EN FRÍJOL CON EXTRACTO DE NEEM Y AGROHOMEOPATÍA DEL MISMO HONGO.

[1]Ceja-Gálvez, C.A., [1]Avalos-Alcántara, Y., [2]Angoa-Perez, M.V., [2]Mena-Violante, H.G., [2]Oregel-Zamudio, E., y [2*]Oyoque-Salcedo, G.

1. Instituto Tecnológico de Jiquilpan. Carretera Nacional S/N, KM 202. C.P. 59510. Jiquilpan de Juárez, Michoacán.
2. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Michoacán. Justo sierra #28. Col. Centro. C.P. 59519 Jiquilpan de Juárez, Michoacán.

*Autor para correspondencia: goyoque@hotmail.com

RESUMEN
El mildiu polvoriento es una de las enfermedades que ataca al cultivo de frijol, su agente causal es el hongo conocido como Cenicilla que llega a reducir su rendimiento hasta un 50%. Su control es con fungicidas sintéticos, los cuales son costosos y dañinos para el medio ambiente además, estos han generado patógeno resistentes. Otras alternativas de control menos agresivas son el uso de extractos de plantas, aceites vegetales. La agrohomeopatía es otro método de control de hongos poco explorado, de bajo costo y no deja residuos tóxicos. El objetivo del trabajo fue evaluar un extracto etanolico de neem y un agrohomeopático del mismo hongo para el control de Cenicilla en planta de frijol. Para esto, se sembró en invernadero semilla de frijol japonés en macetas con 1.5 kg de suelo estéril. A la aparición de 2 hojas verdaderas se asperjaron semanalmente las plantas con los productos. Se realizaron 4 aplicaciones y a la siguiente semana de la última aplicación, se desafiaron las plantas con el hongo. Los tratamientos utilizados fueron: plantas tratadas con extracto de neem, plantas tratadas con agrohomeopático de Cenicilla y plantas tratadas con Cenicilla. Se colocaron 3 repeticiones por tratamiento. Cuando se presentó el daño por el hongo, se evaluó la severidad mediante la escala de Fujiwara y Fujii [8]. Como resultado se tuvo que las plantas tratadas con agrohomeopático de Cenicilla presentaron un 61% de severidad, con neem 74% y las plantas testigo presentaron un 100 % de severidad.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*; *Azadirachta indica*; *homeopático de Erysiphe* sp.

INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de las leguminosas, el frijol es uno de los alimentos básicos más importantes en la dieta del mexicano y la principal fuente de proteína (Ulloa*, et al*., 2011). Parte de las problemáticas del cultivo son las enfermedades producidas por el ataque de hongos, bacterias, nematodos y virus entre otros [2]. Una de importancia es la conocida como Mildiu Polvoriento o Cenicilla que es causada fundamentalmente por cuatro géneros y cincos especies del orden Erysiphales: *Golovinomyces cichoracearum*(DC.) V.P., *Gelyuta* (sin. *Erysiphe cichoracearum* DC), *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Poll. (sin. *Podosphaera fusca* (Fr.) U. Braun y Shishkoff) y *Podosphaera xanthii* (Px) (Castag.) U. Braun y N. Shish (sin. *Podosphaera fusca*) [11]. Esta enfermedad causa bajos rendimientos al atacar hojas ya que se desarrolla grandes cantidades en la superficie de la hoja de polvillo blanco al cual se le conoce como Cenicilla. El daño en las plantas por el hongo es lento, pero llega a causar daños considerables [10]. La Cenicilla se desarrolla mejor en áreas frescas, en lugares con clima cálido y seco, porque en

estas condiciones el viento fácilmente desprende y disemina los conidios, además, se ha establecido que se presenta en tejido suculento del hospedante en ambientes sombreados y frescos [10]. Se han investigado otras alternativas para el control de enfermedades como el uso de extractos tal es el caso del uso del extracto acuoso de gobernadora (*Larrea tridentata* L) para el control de Cenicilla en el cultivo de Melón que en comparación con el control químicos utilizado se obtuvo igual efecto solo que el extracto fue más orgánico y menos dañino para el medio ambiente [4]. Para el control de plagas el extracto de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) es una fuente natural contra una gran variedad de microorganismos patógenos, presenta efectos como insecticida y microbicida, siendo las más importantes la actividad antialimentaria y el bloqueo en el proceso de metamorfosis de larvas [17]. El uso de extracto de Neem para el control de larvas de *Chrysoperla carnea* en manzano que produjo ausencia casi total de las larvas [19]. También, el extracto de hojas de Neem se ha empleado para el control de nematodos gastrointestinales de bovinos [17]. Otra alternativa poco estudiada es el uso de medicamentos homeopáticos, tal es el caso del medicamento homeopático *Osccilococcilum* a la 200 CH que se usó para el control de escaldadura de la hoja de caña de azúcar, enfermedad ocasionada por *Xanthomonas albilineans* [14]. También se sabe que medicamentos homeopáticos pueden inducir la floración de plantas, como fue el uso de un preparado homeopático +vida 200 CH que indujo la floración de *Aphelandra squarrosa* [11]. Se ha mencionade que los medicamentos homeopáticos, constituyen una alternativa en la defensa de los cultivos agrícolas encaminados a la producción de vegetales libres de agrotóxicos, al preservar los recursos naturales y al reducir los costos de producción [14] [5]. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó un medicamento homeopático a base de la misma Cenicilla y el extracto de Neem para el control de Cenicilla en frijol**.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del agrohomeopático

Se recolectaron hojas del árbol de Neem del Platanal y Jiquilpan Michoacán. También, se reunieron hojas de un cultivo de frijol infectadas con Cenicilla de la localidad, Rincón de San Andrés de Sahuayo Michoacán.

Para la elaboración del agrohomeopático de la hoja de frijol infectada con Cenicilla se tomaron 3 g de hojas y maceraron con 10 mL de alcohol a 87° por 20 minutos, después vertieron 1 L de alcohol del 87º en un frasco oscuro de 1L y se agitó con golpeteos sobre la mano por 5 minutos. El agrohomeopático se dejó reposar hasta su utilización en un lugar oscuro, fresco y seco.

Preparación del extracto de Neem

Para la preparación del extracto de Neem se utilizaron 150 g de hojas de Neem molidas en 1 L de alcohol al 87º y se dejó reposar 1 día en un lugar oscuro, fresco y seco.

Control de Cenicilla en fríjol con extracto de Neem y agrohomeopático del mismo hongo

Se sembró en invernadero semilla de frijol japonés en macetas con 1.5 kg de suelo estéril. Cuando aparecieron las primeras 2 hojas verdaderas se asperjaron semanalmente las plantas con los productos por separado. Se realizaron 4 aplicaciones y a la siguiente semana de la última aplicación, se colocó con un pincel estéril polvo de Cenicilla solo un arrastre por hojas y deposito en una hojas superior, intermedia e inferior de la planta. Los tratamientos que se tomaron en cuenta fueron: plantas tratadas con extracto de Neem, plantas tratadas con agrohomeopático de Cenicilla y plantas tratadas con Cenicilla. Se tomaron en cuenta 3 repeticiones por tratamiento. Una vez que apareció el daño por el

hongo, se evaluó la severidad mediante la escala propuesta por Fujiwara y Fujii [8]. Donde 0= no daño, 1= menos de 5% de la superficie de la hoja dañada, 2 = de 5 a 25%, 3 = de 26 a 50% y 4= más del 50% de la superficie dañada de la hoja. Los índices de daño de cada hoja se convirtieron a severidad por planta de acuerdo a la fórmula siguiente:

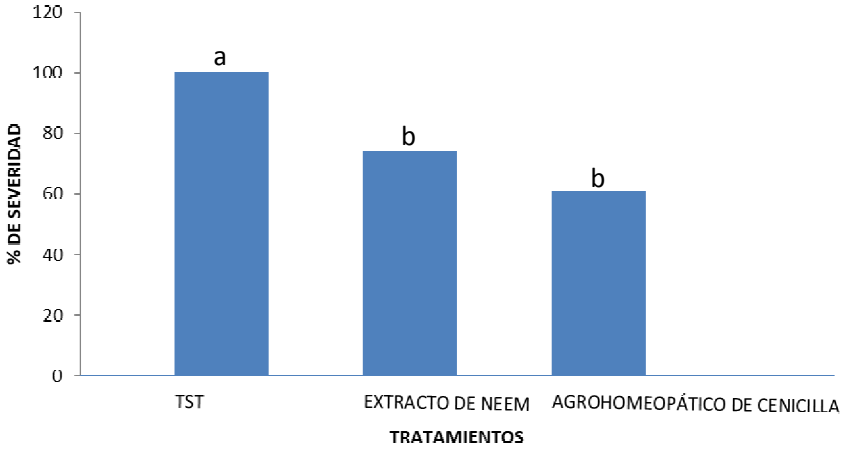
$$S = 100 (0\, n_0 + 1\, n_1 + 2\, n_2 + 3\, n_3 + 4\, n_4) / 4N \quad (1)$$

Dónde:
S= la severidad de daño por planta.
0 a 4= las escalas de daño.
n_0 a n_4= el número de hojas con el correspondiente valor 0 a 4.
N= el número total de hojas evaluadas por planta.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza ANOVA. Las medias se compararon mediante la prueba Tukey ($p \geq 0.05$), mediante el software estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado se tuvo que las plantas tratadas con agrohomeopático de Cenicilla y extracto de Neem, presentaron menor severidad en comparación a las plantas testigo. El agrohomeopático de Cenicilla fue el mejor tratamiento contra Cenicilla (39%) en plantas de frijol (figura 1). El control de enfermedades y plagas en el cultivo de frijol con agrohomeopáticos se ha observado en otras investigaciones. Hanif y Dawar, [12], utilizaron *Arnica montana* y *Thuja occidentalis* (30C) y redujeron la infección de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* oxysporum y *Macrophomina phaseolina* e incrementaron el crecimiento de las planta de frijol mung (*Vigna radiata*). El nosode o agrohomeopático de adultos de *Acanthoscelides obtectus* controló un 80 a 100% la progenie de misma plaga en planta de frijol [6]. Con los homeopáticos de *Corymbia citriodora*, *Calcarea carbonica*, *Silicea* y *Sulphur* se incrementó en plantas de frijol la actividad de enzimas peroxidasas, catalasas, quitinasas y glucanazas, las cuales, inducen resistencia en las plantas [3]. Gama *et al*., [9], trataron plantas de *Agave sisalana* con homeopáticos de *Ferrum metallicum* 9CH para el control de *Aspergillus niger* y obtuvieron menor severidad de daño (28%) en comparación con las plantas sin tratamiento (74% de severidad). Respecto al extracto de hojas de Neem se obtuvo una disminución del daño por Cencilla en la planta de frijol del 26% (figura 1). En otros trabajos el control de Cenicilla fue mayor tal es el caso del realizado por Pérez *et al*., [16] quienes utilizaron emulsión de aceite de Neem (25%) para el control de Cencilla en pepino y obtuvieron un grado de control similar al azoxystrobin. El bajo control con el extracto etanolico de Neem pudiera deberse a que en hoja esta en menor cantidad la azadiractina, compuesto al cual se le atribuyen las propiedades fungicida, nematicida e insecticida [19] [17] [7] ya que se sabe que la azadiractina se encuentra en todas las partes del árbol del Neem pero se concentra en las semillas [1].



CONCLUSIÓN

Se logró el control de Cenicilla con el agrohomeopático del mismo hongo y con el extracto de hoja de Neem (39 y 26% respectivamente). El mayor control se obtuvo con el agrohomeiopático del mismo hongo. Ambos tratamientos pudieran tener el potencial como parte del manejo para el control de Cenicilla en el cultivo de frijol.

REFERENCIAS

[1] Akhila A. and Rani K. Chemistry of the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.), Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 1999, 78, 47–149.

[2] Araya C.M. y Hernández J.C. 2006. Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. Ministerio Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 37 p.

[3] Batista O.J.S., Maia A.J., Schwan E.K.R., Bonato C.M., Gomez C.S.M.T.P. y Savoldini P.M.H. 2014. Activation of biochemical defense mechanisms in bean plants for homeopathic preparations. African Journal of Agricultural. 9 (11). 971-981.

[4] Carbajal R.I. . 2016. Control de Cenicilla con extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata* L.) en el cultivo de Melón en Ceballos, Dgo Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Tesis

[5] Collazo H.M.M. y León R.R.D. 2005. Panorámica mundial del mercado de los medicamentos homeopáticos a partir de las plantas medicinales. Revista cubana de farmacia. 39. 1561-2988.

[6] Deboni TC. 2009. *Preparados homeopáticos e fitoterápicos no manejo de* Acanthoscelides obtectus *Say, 1831 (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado.* Lages: UDESC-CAV. 79p. (Dissertação mestrado).

[7] Esteves F.A.B., Oliveira J.V., Matos C.C.H. 2013. Toxicity of spiromesifen and natural acaricides to *Tetranychus urticae* koch and compatibility with *Phytoseiulus macropilis* (Banks) Ciências Agrárias, Londrina, 34 (6). 2675-2686.

[8] Fujiwara, K. y Fujii, T. 2002. Effects of spraying ozonated water on the severity of powdery mildew infection on cucumber leaves. Ozone Science and Engineering 24. 463-469.

[9] Gama S.V.E., Silva F., Santos I., Malheiro R., Soares F.A.C., Pereira A.J. y Armond C. 2015. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. Agronomy for Sustainable Development. 35 (2). 649-656

[10] Gastelum F.R, Maldonado M.I.E., Beltrán P.H., Apodaca S.M.A., Silva E.M., Martínez V.M.C., Longoria E.R.M., Olivas P.N.G. 2016. Las Cenicillas en cultivos agrícolas de Sinaloa: Situación actual sobre su identificación y líneas futuras de investigación. Revista Mexicana de Fitopatología. 106-129.

[11] González M.N., Martínez C.B., Infante M.D. 2010. Mildiu polvoriento en las cucurbitáceas. Revista de protección vegetal. 25. 2224– 4697.

[12] Hanif A., Dawar S., Tariq M. y Imtiaz F. 2015. Fungicidal potential of homeopathic pellets in the inhibition of root rot fungi and for promotion of crop plants. European Journal of Biology and Medical Science Research. 3(6). 26-39.

[13] Maldonado G.A., Durán D.M.L., Hernández C.R., Martínez T.S.H. y Ruiz E.F.J. 2015. Effect of homeopathic products in the growth and flowering of *Aphelandra squarrosa* var. snowflake (*Acanthaceae*). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6 (6). 1265-1276.

[14] Meneses N., Moreno L., González R. 2004. Agrohomeopatía: una opción ecológica para el campo. Revista de Protección Vegetal**.** 19(3).183-184.

[15] NIIR Board. 2004. Handbook on Neem and Allied Products. National Institute of Industrial Research. New Delhi, India. 478 p.

[16] Pérez Á.R. García E.R.S., Carrillo F.J.A., Angulo E.M.Á., Valdez T.J.B., Muy R.M. D., García L.A.M. y Villarreal R.M. 2010. Control de Cenicilla (*Sphaerotheca fuliginea* Schlechtend.:Fr, Pollaci) con Aceites Vegetales y Sales Minerales en Pepino de Invernadero en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 28.17-24.

[17] Pietrosemoliz S., Olavez R., Montilla T. 1999. Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en control de nematodos gastrointestinalcs de bovinos; Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16(1). 220-225.

[18] Ulloa, J. A.; Ulloa, P. R.; Ramírez, R. J. C. y Ulloa, R. B. E. 2011. ‘‘El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos’’. *Revista Fuente*, 3 (8). 5-9.

[19] Viñuela E., Händel U. y Vogt H. 1996. Evaluación en campo de los efectos secundarios de dos plaguicidas de origen botánico, una piretrina natural y un extracto de neem, sobre *Chrysoperla* carnea Steph. (Neuroptera: *Chrysopidae* V. 22. 97-106.

[20] http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2007102095

EVALUACIÓN DE SUELOS AGRÍCOLAS DE LA REGIÓN DE JIQUILPAN Y SAHUAYO MICHOACÁN.

Rodríguez-González, N. C., Fernández-Rivera, E. y *Oyoque-Salcedo, G.

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Michoacán. Justo sierra #28. Col. Centro. C.P. 59519 Jiquilpan de Juárez, Michoacán.

*Autor para correspondencia: goyoque@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

En México existe una gran diversidad de suelos debido especialmente a su compleja topografía originada por la actividad volcánica en el Cenozoico, el amplio gradiente altitudinal (0 a 5 600 m sobre el nivel del mar), la presencia de 4 de tipos de climas, la enorme diversidad paisajista y tipos de rocas existentes en el territorio. Michoacán es un estado con un marcado contraste ambiental por la confluencia entre dos grandes zonas biogeográficas y una variada topografía que han dado como resultado la presencia de diferentes tipos de suelos y climas que en conjunto sostienen una de las mayores diversidades biológicas. La región Ciénega de Michoacán está constituida por llanos y sierras volcánicas conformados por sedimentos aluviales y rocas ígneas extrusivas [1]. Los municipios como Jiquilpan y Sahuayo, están conformados de suelos vertisoles regolíticos en las partes bajas, ostentan suelos arcillosos expandibles como la montmorillonita con superficie rugosa tipo gilgay que surge como consecuencia de sus propiedades de expansión y contracción con los cambios de humedad, considerados en su planicie como una cuenca endorreica por sus propiedades, que favorece las condiciones de salinidad y sodicidad. Dichas condiciones, hacen los suelos difíciles de manejar por su estructura y no son favorables para los cultivos [2]. Las prácticas de agricultura convencional (labranza mecanizada, monocultivos, poca aplicación de materia orgánica, uso de variedades mejoradas, uso de fertilizantes químicos inorgánicos) también han apoyado a generar esos tipos de suelo cambiando sus propiedades físicas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar suelos agrícolas de la región de Jiquilpan y Sahuayo, mediante la Norma Oficial Mexicana NOM-021 SEMARNAT-2000 [3], para determinar fertilidad.

Palabras clave: Suelos de cultivo, Fertilidad, Michoacán.

REFERENCIAS

[1] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Michoacán Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.2005. La biodiversidad en Michioacán. México D.F.

[2] INEGI. Aspectos generales del territorio mexicano. Recursos Naturales. Edafología. Disponible en: http://mapserver.inegi.org.mx. Fecha de consulta: junio 2017.

[3] NOM-021 SEMARNAT-2000 Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

EVALUACIÓN GENOTÓXICA POR LA CONTAMINACIÓN DEL RÍO SANTIAGO EN JUANACATLÁN vs ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO EN UN MODELO DE GATOS.

[1]Santos-Orozco, D.L., [1]Ramos-Ibarra, M.L., [2]Parra-Cervantes, F.J., [3]Torres-Bugarín, O., Cervantes-de-Parra, E., [4]Real-Navarro, M., [5]Torres-Rodríguez, A.

[1]Lab. Toxicología Genética, Depto. Salud Pública, Div. Ciencias Veterinarias, CUCBA, UDG.
[2]Clínica Familiar IMSS
[3]Laboratorio de Evaluación de Genotóxicos, Programa Internacional de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara.
[4]Lab. Residuos Tóxicos II. Salud Pública, Div. Ciencias Veterinarias, CUCBA, UDG.
[5]Depto. Estudios Socio-Urbanos, Div. Estudios de Estado y Sociedad. CUCSH.

*Autor para correspondencia: Daliabiologia.cucba@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN
En el Municipio de Juanacatlán el nivel de enfermedades ha incrementado de manera importante en los últimos años, esto se asocia a la presencia del rio Santiago el cual es considerado uno de los más contaminados del país, esto se debe que a lo largo de su cuenca pasa por varios corredores industriales entre ellos el corredor industrial del Salto en Jalisco, que vierten sus desechos en él, sin regulación alguna, muchos contaminantes que lleva el rio en su cuenca se consideran genotóxicos, en este estudio se utilizó la prueba de micronúcleos para evaluar el daño genético causado por el nivel de contaminación, empleando un modelo animal de gato doméstico; se realizó frotis de sangre periférica de 15 gatos, y como control se tomaron 15 gatos de zona metropolitana de Guadalajara para hacer el conteo de eritrocitos micronucleados, las frecuencias de encontradas fueron 18.77 ± 5.78. VS 12.68 ± 6.10, en Juanacatlán y zona metropolitana de Guadalajara respectivamente, las cuales muestran diferencia significativa de p=0.009 utilizando t de Student.

Palabras clave: Gato doméstico, eritrocitos micronucleados, Río Santiago, Contaminación, Genotóxicos.

INTRODUCCIÓN

En la década de los 80 se dio el bum de la industrialización en México, en el estado de Jalisco se instaló uno de los primeros corredores industriales ubicado en el municipio de Juanacatlán, una región rica en recursos naturales, sobre todo en agua debido a la presencia del rio Santiago [1]; con el paso de los años y el incremento poblacional, las grandes cantidades de desechos industriales que contienen metales pesados como arsénico, mercurio, plomo, entre otros; así mismo residuos agrícolas (pesticidas y herbicidas), generó la muerte del rio y riqueza natural de la región, convirtiendo a este en uno de los más contaminados en el país y por ende un factor de riesgo para los pobladores[2].

En la actualidad la población de Juanacatlán presenta alto índice de enfermedades infecciosas, crónico-degenerativas, y diversos tipos de canceres, la Secretaria de Salud en 2015 informo que estas enfermedades se pueden asociar al efecto de contaminantes ambientales antes mencionados [3]. Los

metales pesados, así como otros tipos de contaminantes se les clasifica como genotóxicos, porque tienen la capacidad de dañar el ADN, este daño suele ser silente, y se asocia a enfermedades antes mencionadas [4].

Para detectar este daño existen varios métodos uno de ellos es la prueba de micronúcleos (MN); este estudio se puede realizar con un frotis de sangre periférica, para lo cual comúnmente se emplean modelos animales, que tengan un sistema retículoendotelial deficiente y de este modo las células anormales permanezcan en la circulación para ser observadas en eritrocitos de simple frotis sanguíneo. Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que se pierden durante la mitosis celular, por lo que las células hijas en su núcleo, llevan en ADN incompleto [4], [5].

Se han establecido diversos tipos de modelos animales para evaluar los efectos de genotóxicos, uno de estos modelos es el gato doméstico que fue descrito por Zúñiga y col., en 1996, estableciendo su frecuencia basal de eritrocitos micronucleados (EMN) [4], [5], los gatos presentan un comportamiento territorial, por lo que rara vez salen de su zona de confort, esto los hace ideales para realizar estudios de monitoreo que requieran abarcar solo un área en específico [5], [6].

MATERIALES Y MÉTODO.

Se muestreo un total de 30 gatos (15 en Juanacatlán y 15 de ZMGDL), tomando en cuenta los siguientes parámetros: sexo indistinto, edad mínima de 6 meses y 3 meses como tiempo mínimo de habitar en la zona, se realizaron dos frotis de sangre periférica de cada gato;

Preparación de muestras y Análisis al microscopio

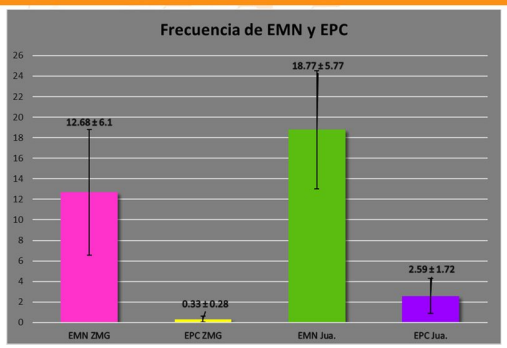
Las muestras se fijaron en etanol, posteriormente se tiñeron con naranja de acridina (tinción específica para ácidos nucleicos), se procedió a la lectura de las muestras en el microscopio óptico de florescencia para realizar el conteo de eritrocitos micronucleados (EMN)/10,000 ET (eritrocitos totales), eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN)/1,000 eritrocitos policromáticos (EPC) y la proporción de EPC/1,000 ET. Se realizó estadística descriptiva (promedio ± desviación estándar) y se aplicó estadística inferencial (prueba t Student) con valor de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Encontramos que las frecuencias de EMN en gatos que habitan en Juanacatlán es de 18.77 ± 5.78. VS 12.68 ± 6.10 para gatos de la ZMG mostrando una diferencia significativa de P=0.009; las frecuencias de EPC fueron para los gatos de Juanacatlán fue 2.59±1.72 y de 0.33±0.28 para los de ZMG, mientras que para las frecuencias de EPCMN fue cercana a 0 debido a la baja presencia de eritrocitos policromáticos, característica particular de los felinos; así como de otras especies descritas por Zúñiga-González y cols.

Cuadro1. Aquí se esquematizan las frecuencias de EMN y EPC de cada zona de estudio.

Grupo	N	EMN	EPC
Juanacatlan	15	18.77 ± 5.78	2.59 ± 1.72
Zapopan	15	12.68 ± 6.10	0.33 ± 0.28



Grafica 1. Se representan los valores de EMN y EPC con media ± desviación estándar.

Esto nos indica que el daño genético en las Zona de Juanacatlán es más elevado que en la zona metropolitana de Guadalajara, a pesar de que la concentración poblacional es menor en Juanacatlán.

CONCLUSIÓN

El incremento significativo en la frecuencia de EMN en sangre periférica de los gatos de Juanacatlán vs los de la ZMG; indudablemente, evidencia daño al ADN ocasionado por la contaminación de agentes cancerígenos (metales pesados, entre otros), que se encuentran presentes en Juanacatlán. Por lo que este trabajo sugiere que se realicen monitoreos recurrentes, no sólo cuantitativos de los contaminantes en el río de la localidad donde se sospeche que existe mayor carga de contaminantes cancerígenos; sino también, el efecto genotóxicos empleando bioindicadores como el gato.

REFERENCIAS

[1] Delgadillo, H. P., & Gutiérrez, J. S. (2016). El contexto de la problemática ambiental de los municipios de Juanacatlán y El Salto, Jalisco y la educación ambiental como proceso articulador de la participación comunitaria para el desarrollo sustentable. Mercados y Negocios (1665-7039), 8, 2-9.

[2] González, P. M., & Hernández, E. (2009). Impactos de la contaminación del Río Santiago en el bienestar de los habitantes de El Salto, Jalisco. Espacio

[3] Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS)/INEGI 2002 - 2013. en "información relevante estadística de salud del municipio de Juanacatlán, secretaria de salud. 2015

[4] Zúñiga, G., Torres-Bugarín, O., Ramírez-Muñoz, M.P., Ramos, A., Fanti-Rodríguez, E., Portilla, E., García-Martínez, D., Cantú, J.M., Gallegos-Arreola, M.P., Sánchez-Corona, J. (1996). Spontaneous micronuclei in perípteras Bloom erythrocytes from 35 mammalian species. Mutation Research/Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenesis, 369, 123-127

[5] Zamora-Pérez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos-Ibarra, M.L., Batista-González, C.M., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Rodríguez-Ávila, J.L., Zúñiga-González, G.M. (2008). Los Felinos: ¿Una alternativa en estudios de toxicología genética? International Journal a Tropical Bióloga and Conservativo, 56(2). 696-974

[6] Comportamiento del gato, http://www.mergar.com

ANÁLISIS DEL INCREMENTO DE LA OCURRENCIA DE INCENDIOS FORESTALES EN RELACIÓN AL AUMENTO DE LA SUPERFICIE AGRÍCOLA.

Flores-Garnica, J. G. y *Hurtado-Casillas, M.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

*Autor para correspondencia: marianahc_22@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Los incendios forestales representan un factor importante que impacta a los ecosistemas forestales de México. Este impacto está en relación a su frecuencia e intensidad, además de las condiciones de los ecosistemas forestales. Para evitar, o disminuir, estos impactos se han establecido varias estrategias que se enfocan tanto a la prevención, como al combate y la restauración. También se han definido varios enfoques operativos, técnicos y científicos, para apoyar la toma de decisiones, los cuales se engloban bajo el concepto de manejo del fuego. Sin embargo, es muy importante considerar que la mayor parte de los incendios forestales (98%) en México son causados por actividades antropogénicas. Principalmente agricultura y ganadería. Sin embargo, no se han encontrado estudios en los que se relacione el incremento de la superficie agrícola con la ocurrencia de incendios forestales. Lo cual es información básica para establecer áreas prioritarias contra incendios forestales. Debido a esto, el propósito de este trabajo fue establecer una correlación estadística entre el incremento de la superficie agrícola con el aumento en el número de incendios. Para esto se hizo una evaluación de los recursos forestales del estado de Jalisco y una delimitación de áreas agrícolas. Así mismo, con base información estadística de la Comisión Nacional Forestal, se definió el número de incendios forestales. Posteriormente se definieron los modelos de correlación correspondientes. Este análisis se hizo para cada año que comprende el periodo del 2005 -2015. Para lo cual se trabajó con imágenes del sensor Landsat, con lo que se basó un análisis multitemporal, donde se evaluaron los cambios de superficie agrícola. Para esto se realizó un modelo espacial, integrando el DNVI, y el número de incendios registrados las zonas donde ha habido un cambio de uso de suelo de lo forestal a lo agrícola. Los resultados obtenidos muestran una correlación positiva entre el incremento del área agrícola con el aumento de los incendios forestales. Lo cual debe usarse para apoyar las estrategias de prevención de incendios forestales, que deberían estar enfocada más en las áreas agrícolas, que en las áreas forestales. Esto implica la integración de estudios sociales y antropológicos para que la gente que hace uso del fuego en sus actividades agrícolas lo evite o, por lo menos, lo haga en forma segura.

Palabras clave: índice de vegetación, NDVI, cambio de uso de suelo, LANDSAT

REFERENCIAS

[1] Bonnor G., M. 1972. Cost of a small forest inventory. Canadian Journal of Forest Research, 2, pp. 45-48.

[2] Burrough, P. A. y McDonnell, R. 1998. Principles of geographical information systems. Oxford University Press. 333 p.

[3] Flores G., J. G. 1996. Aplicacion de sensores remotos y sistemas de informacion geográfica para el mapeo de riesgo de incendios forestales. INIFAP, SAGAR. Campo Experimental Colomos. Folleto Informativo No.1.

BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS RECONOCIDOS POR MOLÉCULAS SÉRICAS SANGUÍNEAS DE UN BOVINO INMUNOPROTEGIDO CONTRA *Anaplasma marginale*.

[2]Vergara-Rivera, E., [1]*Amaro-Estrada, I., [1]Preciado-de-la-Torre, J.F., [1]Cobaxin-Cárdenas, M.E.., y [1]Rodríguez-Camarillo, S.D.

1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Jiutepec Morelos, México.
Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534 Col. Progreso, Jiutepec Morelos, México, C.P. 62550.
2. Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Av. Universidad 1001 Colonia Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62210.

*Autor para correspondencia: amaro.itzel@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa no contagiosa ocasionada por *Anaplasma marginale*, una bacteria intraeritrocítica obligada que se aloja cerca del margen interno de los glóbulos rojos, con tamaño entre 0.2 y 1 micra. Esta rickettsia tiene a las garrapatas como principal vector biológico y puede afectar a bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y algunos rumiantes salvajes. Los signos característicos de la anaplasmosis son: anemia, pérdida de peso, fiebre, ictericia y eventualmente la muerte; lo que ocasiona disminución en la producción y, por tanto, cuantiosas pérdidas económicas en el sector agropecuario. El diagnóstico de la infección se basa en la visualización directa de la bacteria por microscopía o identificación de ADN del patógeno mediante técnicas moleculares o bien de forma indirecta a través de la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas. Una detección temprana de la enfermedad permite su control mediante la aplicación de antibióticos, sin embargo, en muchas ocasiones, el animal permanece como portador de la bacteria. A la fecha, en México no existen vacunas comerciales que eviten la ocurrencia y propagación de la enfermedad, por lo que se plantea la necesidad de identificar péptidos o proteínas con propiedades inmunogénicas para su uso como agentes vacunales. En este estudio, se realizó el aislamiento de péptidos que interaccionan con moléculas del suero sanguíneo proveniente de un bovino hiperinmunizado contra *Anaplasma marginale*. El bovino 135, el cual está inmunoprotegido contra *A. marginale* fue estimulado con cuerpos iniciales de la rickettsia y utilizado como donador. El suero obtenido se dializó para eliminar sales, metabolitos y otros componentes de bajo peso y fue utilizado como antígeno para la realización de tamizados contra una librería de péptidos de 12 aminoácidos desplegada en fagos, la cual contiene una diversidad de $1x10^9$ variantes. Se recuperaron aquellos fago-péptidos que permanecieron unidos al antígeno después de lavados y una vez obtenidas clonas separadas de la última ronda se amplificaron para evaluar las interacciones con el antígeno mediante pruebas ELISA. A partir de las placas seleccionadas se obtuvo el material genético para la secuenciación del ADN y determinación de ligandos inmunodominantes; así como su posible similitud con componentes reportados en el genoma de *Anaplasma marginale*, con miras en la propuesta de nuevos métodos inmunoprofilácticos o bien la optimización de métodos de diagnóstico.

Este trabajo fue financiado a través de los proyectos INIFAP SIGI 11343533011 y SEP-CONACyT 252577.

Palabras clave: Despliegue en fagos; Anaplasmosis bovina; *Anaplasma marginale*; Vacunas.

REFERENCIAS

[1] Corona, B., Rodriguez, M. & Martinez, S. (2004) Anaplasmosis bovina, REDVET, VI (4).

[2] Brown, W. C., Palmer, G. H., Lewin, H. A. & McGuire, T. C. (2001). CD4+ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. Infection and immunity. 69 (11). 6853–6862.

[3] Villa-Mancera, A., Reynoso-Palomar, A., Etrera-Quintana, F., Córdova-Izquierdo, A., Olivares-Pérez, J., Zambrano-González, M., Trejo-Córdova, A. & Carreón-Luna, L. (2015). Identificación de nuevos péptidos de una biblioteca de despliegue en fagos con un anticuerpo monoclonal específico a la proteína N del virus PRRS. Archivo de medicina veterinaria 47. 325-331.

USO DEL ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO CON APLICACIÓN POTENCIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO, CARBONO Y PH EN COMPOSTAS DE ESTIÉRCOL.

*Quiñones-Islas, N. S., Jacobo-Salcedo, M., Muñoz-Villalobos, J. A., y García-Mariscal, K.

INIFAP, Campo Experimental Tecomán. Km 35 Carretera Colima-Manzanillo, C.P. 28100, Tecomán, Colima. INIFAP, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Relación Agua, Suelo, Planta y Atmósfera. Km 6.5 margen derecha Canal de Sacramento, C.P. 35140, Gómez Palacio, Durango.

*Autor para correspondencia: quinones.nayeli@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La quimiometría en conjunto con la espectroscopia infrarroja cercana (NIRS) en los últimos años ha permitido la identificación y cuantificación en la composición de las compostas como abono orgánico. Fueron utilizadas como una metodología de análisis rápido para la cuantificación de la composición química de compostas elaboradas a partir de dos tipos de estiércol bovino (ganado de engorda y ganado lechero) en diferentes proporciones (en un rango de 0 a 100%) durante dos años de evaluación (2014 y 2015). Los parámetros evaluados fueron el contenido de carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (NT) y potencial de hidrógeno (pH); a los cuales se les realizó un análisis estadístico descriptivo (promedio, mínimo, máximo y desviación estándar) con un diseño completamente al azar para comparar los resultados obtenidos durante los dos años de estudio e identificar las diferencias significativas ($p<0.05$). Los modelos quimiométricos de calibración óptimos fueron desarrollados empleando el algoritmo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR). La validación de los modelos desarrollados fue evaluada en base al menor error estándar de predicción (SEP) y los mayores coeficientes de correlación (R2). Los resultados obtenidos para el COT fueron de un SEP de 0.24 y R2 de 0.98; para pH un SEP de 0.08 y R2 de 0.97; y para NT un SEP de 0.10 y R2 de 0.95. Demostrando ser un método analítico simple y no destructivo que puede ser empleado para predecir varias propiedades simultáneamente, con una capacidad de predicción óptima y buena dimensionalidad en los datos del modelo. Permitiendo, la toma de decisiones para la correcta aplicación de las compostas como abono orgánico para suelos y su aplicación en la agricultura.

Palabras clave: análisis multivariable; quimiometría; abono orgánico; FTIR-NIR.

REFERENCIAS

[1] Beebe KR, Pell JL, Seasholtz MB. 1998. Chemometrics: A practical guide. New York, USA: Wiley Interscience Publication.

[2] Cohen, L. J., Xing, L., & Han, L. J. 2010. Influence of Data Preprocessing on the Quantitative Determination of Nutrient Content in Poultry Manure by Near Infrared Spectroscopy. J. Environ. Qual., 39(5), 1841–1847.

[3] Vergnoux, A., Guiliano, M., Le Dréau, Y., Kister, J., Dupuy, N., & Doumenq, P. 2009. Monitoring of the evolution of an industrial compost and prediction of some compost properties by NIR spectroscopy. Science of the Total Environment, 407(7), 2390–2403.

EXPRESIÓN RECOMBINANTE Y PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA CONSERVADA DE LA RICKETTSIA *Anaplasma marginale*.

[2]Castillo-Martínez, K.B., [1*]Amaro-Estrada, I., [1]Martínez-Salgado, J., [1]Quiroz-Castañeda, R.E., [2]Pineda-Gutiérrez, J., [1]Rodriguez-Camarillo, S.D.

1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534 Col. Progreso, Jiutepec Morelos, México, C.P. 62550.
2. Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
Boulevard Cuauhnáhuac #566, Col. Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos. C.P. 62550.

*Autor para correspondencia: amaro.itzel@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN
La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa no contagiosa causada por la rickettsia *Anaplasma marginale*; la cual infecta a los eritrocitos y puede causar pérdida de peso, anemia severa, aborto, depresión y la muerte del animal. Se transmite de manera biológica (por vectores y transmisión vertical) y mecánica (insectos hematófagos y uso de material contaminado). En México, estudios económicos han estimado pérdidas por más de tres mil millones de pesos tan sólo en 1980, cifra que de actualizarse presentaría más de 130 millones de dólares. A pesar de los intentos para desarrollar una vacuna basada en organismos vivos o atenuados, en México no está disponible de manera comercial ningún método profiláctico contra la anaplasmosis bovina. Por lo que en este trabajo se realizó la expresión recombinante de una región codificante identificada en el genoma de *A. marginale*, la cual en un futuro pudiera ser parte de la formulación de una vacuna contra esta enfermedad. El gen *am592* codifica para una proteína anotada como hipotética, posiblemente localizada en la superficie de la membrana externa de la rickettsia. Análisis bioinformáticos predicen que está conformada por regiones alfa hélice y en mayor proporción por hojas beta. Contiene dos posibles motivos funcionales Surface_AG_2 y OMP_b-brl, los cuales suelen presentar conformación de barril y formar canales involucrados en la transferencia de sustancias entre la bacteria y el medio. En este trabajo, un fragmento que codifica para 199 residuos de la proteína se clonó en un plásmido que añade una etiqueta de seis histidinas, es inducible por IPTG y se transformó para su expresión en dos cepas de *E. coli*. La expresión se llevó a cabo en medio LB adicionado con 1% de glucosa e induciendo con 1mM IPTG cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial temprana. Las fracciones periplásmicas y citoplásmicas se visualizaron en geles de Tricine-SDS-PAGE y la proteína fue inmunodetectada en Western-Blot y Dot-Blot, utilizando anticuerpos específicos para la etiqueta de histidinas. La proteína AM592 se ha predicho como una proteína de superficie con un potencial como antígeno y una función importante en la etapa inicial de infección. Una vez que la proteína recombinante sea purificada, se llevarán a cabo ensayos que permitan determinar sus propiedades antigénicas e inmunogénicas, lo que elucidará la posibilidad de utilizarla como agente vacunal.
Este trabajo es financiado parcialmente a través de los proyectos: INIFAP Conservación de germoplasma de la rickettsia *Anaplasma marginale* SIGI 1224412467 y SEP-CONACyT 252577.

Palabras clave: Anaplasmosis bovina; rickettsia; vacunas; proteínas recombinantes.

REFERENCIAS

[1] B. B. Cano, "Caracterización del gen *am592* en aislados mexicanos de Anaplasma marginale, con respecto de su variabilidad y potencial inmunogénico, Tesis, Universidad Politécnica del Estado de Morelos, México, 2014.

[2] A. L. Muñoz, "Anaplasmosis", Monografía, Universidad Autónoma Agraria "ANTONIO NARRO "Unidad Laguna División Regional de Ciencia Animal, Torreón Coahuila, México, 2008.

[3] C.S D Rodríguez, O.M.A García, T.R Aboytes, A.G.J Canto, R. Barigye, "Inmunología e inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis bovina", Ciencia Veterianaria, Vol.9, pp. 124-147, 2003-2004.

CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE RENDIMIENTOS EN EL CONTENIDO DE ACEITE Y PROTEÍNA EN MATERIALES DE PIÑÓN TROPICAL ESTABLECIDOS EN EL ESTADO DE COLIMA, MÉXICO.

*Quiñones-Islas, N. S., García-Mariscal, K., Lazcano-Escobar, J. F. y Martínez-Ramírez, N.

Campo Experimental Tecomán - INIFAP. Predio la escondida, Km 35 Carretera Colima-Manzanillo. C.P.28100. Tecomán, Colima. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada - IPN. Ex-Hacienda San Juan Molino, Km 1.5 Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla. C.P. 90700. Tlaxcala.

*Autor para correspondencia: quinones.nayeli@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Actualmente en México se realizan estudios sobre alternativas para la generación de combustibles renovables que sean amigables con el medio ambiente, que su producción sea rentable y no compita con la producción de alimentos. El Piñón tropical es una planta oleaginosa que recientemente ha llamado la atención de diversos países, no solo por sus características agronómicas, sino principalmente por sus características químicas como el alto contenido de aceite (28-60%) y su contenido proteico (18-40%). Lo que permite al cultivo ser empleado para la producción de biodiesel y el aprovechamiento de sus residuos para la formulación de alimentos para consumo animal. El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología del Campo Experimental Tecomán del INIFAP. Se evaluaron los contenidos de aceite y proteína en 20 materiales de piñón tropical establecidos en el banco de germoplasma del campo experimental Tecomán en el estado de Colima y colectados de diferentes localidades en los estados de Colima, Jalisco y Michoacán. Se empleó el método soxhlet automatizado para la cuantificación del contenido de aceite (AOCS, Am 5-04) y para la determinación del contenido de proteína el método Dumas por combustión interna (AOAC, 968.06). Los experimentos fueron realizados por triplicado, utilizando 0.13 g por muestra procesada y un análisis estadístico descriptivo con un diseño completamente al azar para comparar los resultados obtenidos entre los ecotipos de estudio e identificar las diferencias significativas ($p<0.05$). De acuerdo con los resultados, se obtuvieron porcentajes en los contenidos de aceite del 28% al 65% y proteína del 19% al 26%. Se logró identificar al material COL-TEC-COL con los mayores contenidos de aceite (65.53%) y proteína (26.55%).

Palabras clave: Bioenergía; Valor agregado; Jatropha

REFERENCIAS

[1] FAO. 1991. Protein quality evaluation. FAO, Food and Nutrition Paper. 51, pp. 4-66.

[2] López A.R., Peralta L.,López M. M., Martínez A. L. 2010. Caracterización bioquímica de las proteínas de la semilla de Jatropha curcas. Tesis de maestría. Centro de desarrollo de productos bióticos del Instituto Politécnico Nacional.

[3] Quiñones I.N., García M.K. y Orozco S.M. 2013. Evaluación del rendimiento de ecotipos de Jatropha curcas como alternativa de producción de biocombustibles en el estado de Colima. VIII Reunión Nacional de Investigación Agrícola. Boca del Río, Veracruz, México. pp. 253.

DINÁMICA SUCESIONAL DE LA VEGETACIÓN ANDINA DE LOS SECTORES CHAPINERO Y LAURELES DEL EMBALSE NEUSA (COLOMBIA).

*Melo-Quintana, G., y Agudelo-López, E.

Universidad Santo Tomás. Vicerrectoría Universidad Abierta y a Distancia. Facultad de Ciencias y Tecnologías. Programa de Administración Ambiental y de los Recursos Naturales. Carrara 10 N 72-50 Bogotá Colombia.

*Autor para correspondencia: germanmelo@ustadistancia.edu.co

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

La presión sobre los recursos naturales como resultado de la actividad antrópica ha provocado un profundo cambio de vegetación en el embalse del Neusa ocasionando un alto impacto ambiental en la zona. En el embalse del Neusa el límite superior del bosque nativo se encuentra alrededor de los 3500 msnm. Debido a la intervención humana para este estudio se tuvo en cuenta la franja altitudinal comprendida entre los 3200 y 3300 msnm. La investigación analizó las alteraciones que ha sufrido la vegetación de los sectores Chapinero y Laureles del embalse del Neusa logrando determinar el cambio de la vegetación arbórea frente a los diferentes fenómenos de disturbio. Los métodos empleados incluyeron dos fases: la definición del ecosistema de referencia y la evaluación del sistema a través de sus relaciones ecológicas fundamentales por medio de la identificación de especies nativas, esto generó una lectura del estrés posdisturbio de la zona. Como resultado se determinó que la vegetación está compuesta por 1200 individuos distribuidos de la siguiente manera: 815 pertenecientes a Angiospermas según el sistema de clasificación APG III (76.9%), este a su vez se compone por 16 familias y 14 géneros. Con respecto a gimnospermas se registró un total de 385 (23.1%) conformado por una familia y un género. El estudio logró determinar el poder considerar la zona de Laureles como un refugio potencial para las especies que sean menos tolerantes a los cambios de cobertura y la zona de Chapinero para especies con mayor grado de adaptación a los cambios. Sumado a lo anterior, se concluye que el ecosistema debe ser más investigado para poder generar una retrospectiva del estado original del sistema; por tal razón es necesario aumentar estudios contemplando un mayor tiempo y número de variables. La investigación contribuyó al conocimiento de la vegetación presente en esta área, teniendo en cuenta las áreas conservadas y transformadas, para la futura toma de decisiones.

Palabras clave: Vegetación, Disturbio, Taxonomía, sucesión, antrópico, paisaje.

REFERENCIAS

[1] Ademoh, F. O., & Muoghalu, J. I. (2017). Temporal pattern of tree community dynamics in a secondary forest in southwestern Nigeria, 29 years after a ground fire. Global Ecology and Conservation, 9, 148-170.

[2] Batistella, M., Robeson, S., & Moran, E. F. (2003). Settlement design, forest fragmentation, and landscape change in rondônia, amazônia. Photogrammetric Engineering & Remote Sensing, 69(7), 805-812.

[3] Brühl, C. A., Eltz, T., & Linsenmair, K. E. (2003). Size does matter–effects of tropical rainforest fragmentation on the leaf litter ant community in Sabah, Malasia. Biodiversity and Conservation, 12(7), 1371-1389.

VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE ACEITES ESENCIALES EN *Lavandula dentata L. var. candicans* BATT.

[*1]Fierro-Álvarez, A., [1]González-López, M., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A.

1. Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.

*Autor para correspondencia: agrouam_x@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Lavandula dentata L, var. *candicans* Batt, familia Lamiaceae. El espliego de jardín, se utiliza en jardinería y no en perfumería como la Lavandula angustifolia Mill. y otras lavandas. Tiene propiedades aromatizantes, medicinales (calmantes). Sus hojas son de un color verde gris y margen de dientes, las espigas son cortas con flores azul lavanda pálido floración casi todo el año. Las flores de esta lavanda no se recomiendan para el consumo humano (García et al, 1987). Esta descripción se basa en nuestra investigación y las observaciones que hemos hecho de esta planta que crece adecuadamente en contenedores, en vivero y jardines. Sus aceites esenciales son antisépticos, cicatrizantes y bactericidas, empleados para curas llagas e infecciones de la boca y el estómago, usada en aromaterapia al atribuírsele propiedades calmantes y relajantes como sucede con la mayoría de las lavandas. Es la especie de lavándula muy cultivada en jardines, como planta ornamental. En México, es la única especie disponible, y aclimatada adecuadamente para el clima templado de altura del país. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los contenidos y rendimientos de aceites esenciales de en las diferentes partes de plantas adultas al momentos y durante la floración, en plantas cultivadas a cielo abierto y bajo cubierta plástica en contendores. Los resultados mostraron que existen variaciones significadas en los rendimientos y contenidos de aceites esenciales en las diferentes partes de la plata y cultivadas bajo cubierta y a cielo abierto, y en diferentes momentos durante la floración.

Palabras clave: lavanda, aromática, aceites esenciales, ornamental, medicinal.

REFERENCIAS

[1] García, V. M. I.; García, V. M. C. y Velazco, N. A. 1987. Composición química de aceites esenciales de Lavandula dentata L. en España. VII Congreso Nacional de Química (Agraria y Alimentaria/2), Sevilla, España.

EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE *Lavandula angustifolia* MILL. EN LA CD. DE MÉXICO.

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A.

1. Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.

*Autor para correspondencia: andresfierro_agro@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Lavandula angustifolia Miller (= L. officinalis Chaix; L. spica L.p.p; L vera DC.), lavanda fina. Sus flores, son de color azul-violáceo, se agrupan en una inflorescencia, con brácteas florales anchamente ovales y puntiagudas. Se utilizan las espigas florales que constituyen la parte utilizada, se destinan a la obtención de aceite esencial, las flores se utilizan como ramos secos o pueden formar parte de mezclas de infusiones (Álvarez et al., 1968), también tiene usos en fitoterapia, perfumería, fabricación de jabón y cosmética, ambientadores (aceite esencial), farmacia (corrector de olor y para perfumar las cremas), condimentación (aromatizante del te, de confituras de carne, etc.), apicultura (miel a partir de campos de lavanda). La planta viva se utiliza en jardinería. Se multiplica por semillas o por esquejes, pero de forma natural las semillas presentan de baja a nula germinación. En México no se encontraron reportes agronómicos de esta especie aromática, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la germinación de esta especie aromática de amplio uso medicinal y aromático. El trabajo se desarrolló en el año 2016 en un Predio de la Colonia El Molino, Iztapalapa, Cd. de México. Los resultados mostraron que la las semillas de esta especie presentan dormición al obtenerse nula germinación sin tratamiento de las semillas, por lo que se utilizaron cinco diferentes concentraciones de AG (ácido giberélico) para inducir su germinación, se encontró que las concentraciones de 200 y 250 ppm de AG produjeron germinaciones del 90 y 80 % respectivamente, por lo que su uso se recomienda como tratamiento pregerminativo para una adecuada multiplicación de esta especie medicinal, aromática.

Palabras clave: lavanda fina, aromática, aceites esenciales, ornamental, medicinal.

REFERENCIAS

[1] Álvarez, T.M.C., M. Gómez, M. y Blesa, C. 1968. Influencia de diferentes pretratamientos sobre la germinación de semillas de «Lavandula spica». Pharm. Medit., 1:7-28.

PROPAGACIÓN DE DOS ESPECIES DE FLORIPONDIO (*Brugmansia sp*.) EN LA CD. DE MÉXICO.

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A.

1. Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.

*Autor para correspondencia: andresfierro_agro@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Brugmansia aurea Lagerh y Brugmansia candida Pers, los Floripondios han formado parte del paisaje cultural en América y en México, habita normalmente en los jardines y huertos de las casas (Flores, 2011). Se utiliza como una planta medicinal, para aliviar resfriado común, dolores de cabeza, para desinflamar paperas, contra el asma y dolores reumatoides. Contiene la escopolamina, alcaloide afecta el sistema nervioso central, algunas formas farmacéuticas que contienen escopolamina en baja cantidad se usan para tratar patologías por espasmos gastrointestinales, uterinos, en las vías biliares y urinarias, y en el aparato genital femenino, gracias a su efecto sedante (Aguilar y Zolla, 1982). Estas especies se pueden propagar por semilla y esquejes, las semillas presentan muy baja germinación, por lo que su propagación comercial es por esquejes, y en relación con su propagación vegetativa la información disponible es muy limitada para México, por lo que el objetivo fue la evaluación de la propagación vegetativa de estas dos especies por tres tipos de esquejes y en dos épocas del año. El trabajo se desarrolló en El molino Iztapalapa, Ciudad de México. Se evaluaron tres tipos de esquejes: herbáceos, semileñosos, leñosos en dos épocas del año (finales del invierno y durante el verano de 2016). En los tres tipos de esquejes y para las dos especies se evaluó el uso y no uso de auxinas para enraizado. La variable evaluada fue el porcentaje de esquejes enraizados a los 50 días después de la siembra. Las medias se compararon mediante un análisis de varianza con un diseño bloques al azar. Los resultados mostraron que los tratamientos con uso de auxinas sintéticas fueron mejores y mostraron diferencias significativas con el no uso, además para los diferentes tipos de esquejes en las dos épocas del año

Palabras clave: Esquejes, propagación, medicinal, toxica, épocas del año.

REFERENCIAS

Aguilar, C. A. y Zolla, C. 1982. Plantas tóxicas de México. México, D.F., Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria, Instituto Mexicano del Seguro Social. 271 p, ISBN: 9688241490. México.

Flores H. M. A. 2011. Compilación bibliográfica Brugmansia spp. Trabajo Recepción de Químico Farmaceútico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. Orizaba Veracruz, México.42 pp.

PROPAGACIÓN DE GERANIO DE OLOR (*Pelargonium graveolens L. Var. Vera*) EN LA CD. DE MÉXICO.

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A.

1Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.

*Autor para correspondencia: andresfierro_agro@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Pelargonium graveolens L. var. Vera (geranio de olor), en México se cultiva a una escala muy pequeña de forma comercial y doméstica. Sin efectos terapéuticos comprobados. Las propiedades atribuidas son como tónica, antidiabética y astringente, también se usa en el tratamiento de afecciones del corazón, astenia, gastroenteritis, hemorragias y anginas (gargarismos), además como ornamental y el aceite esencial, en la industria cosmética y perfumería (Soto y Sousa, 1995). Su multiplicación es asexual (esquejes), los trabajos públicos en relación su propagación y cultivo en México son nulos, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar su propagación asexual utilizando tres tipos de esquejes y en tres épocas del año. El trabajo se desarrolló en un predio de la Colonia El Molino, Iztapalapa, Cd. de México, durante el año 2016. Se evaluaron tres tipos de esquejes (herbáceos, semi-leñosos y leñosos) y en tres épocas del año al inicio de la primavera, verano y el otoño, en todos se evaluó el uso o no de auxinas para enraizamiento, al momento de la siembra auxina sintética comercial para enraizamiento en 1500 ppm y durante el desarrollo en enraizado de auxina sintética en concentración de 400 ppm. Los resultados mostraron diferencias significativas favorables para los esquejes que se usaron auxinas mostraron prendimientos entre el 70 y 90 % con respecto a los que no se usaron de entre 50 y 30 %, tanto al momento de siembra como durante su desarrollo, en relación con la época del año, la mejor época para la propagación vegetativa fue la primavera, seguido del otoño y por último el verano, con 80, 70 y 50 % respectivamente. Se recomienda para su multiplicación por esquejes el uso de auxinas al momento de la siembra y durante su desarrollo, y las mejores épocas del año para su propagación son

Palabras clave: geranio de olor, esquejes, auxinas, multiplicación, época del año.

REFERENCIAS

[1] Soto, N. J. C. y Sousa, M. 1995. Plantas medicinales de la Cuenca del Río Balsas. Instituto de Biología-UNAM, México. 198 pp.

PROPAGACIÓN DE MASTRANZO (*Mentha x rotundifolia* (L.) HUDS) EN LA CD. MEXICO.

[*1]González-López, M., [1]Fierro-Álvarez, A., [2]Agapito-Amador, M.E. y [3]Monsalvo-Castillo, C.A.

1Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.

*Autor para correspondencia: andresfierro_agro@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Mentha X rotundifolia (L.) Huds), conocida en México como mastranso, especie nativa de Europa, naturalizada en América, se reporta en Coahuila, Distrito Federal, Durango, Hidalgo, Estado de México, Oaxaca, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998). Es una planta herbácea perenne, con pelos largos, muy entrecruzados, pegajosos, de 0.3 a 1.5 m de alto, de hojas opuestas, sésiles, ovado-triangulares a casi circulares, base ligeramente acorazonada, superficie rugosa, con pelos largos, suaves y entrecruzados en la cara inferior. La inflorescencia crece Hacia la punta de los tallos, uno o más grupos densos, cilíndricos o cónicos, compuestos de numerosas flores, acompañadas de brácteas puntiagudas y bractéolas más pequeñas y muy angostas (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Es una planta Aromática silvestre y medicinal, se utiliza para té de tiempo, también tiene efectos medicinales por sus aceites esenciales; actúa contra flatulencia y tiene actividad antibacterial (antiséptico) y febrífugo (baja la fiebre), es un componente de salsas de menta y se puede utilizar para repelar insectos y roedores. No se encontraron reportes sobre su propagación y cultivo, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar su propagación vegetativa, y algunos aspectos de su cultivo. El trabajo se desarrolló en el año 2016 en un Predio de la Colonia El Molino, Iztapalapa, Cd. de México. La metodología implico los protocolos para evaluar diferentes técnicas de propagación utilizando esquejes, así como diferentes sustratos, su nutrición y el impacto de plagas sobre su crecimiento y desarrollo. Los resultados sobre su propagación vegetativa mostraron que presenta algunas limitantes dependiendo de la época del año siendo mejor en primavera-verano su cultivo en contenedores es muy adecuada para su

Palabras clave: aromática, menta, cultivo, propagación.

REFERENCIAS

[1] Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

[2] Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

ANÁLISIS MULTIVARIADO EN ECUACIONES ALOMÉTRICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO SECO EN COMBUSTIBLES FORESTALES VIVOS.

*Assad-Alvarez, A. y Flores-Garnica, J.G.

INIFAP

*Autor para correspondencia: alassalv@gmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

En el manejo de incendios forestales se requiere, entre otros aspectos, conocer bien cuál es la cantidad y calidad de los combustibles forestales, los cuales se clasifican, en forma general, en muertos y vivos. Al respecto, la mayoría de las estimaciones de combustibles forestales se hacen en relación a combustibles muertos. Sin embargo, pocas son las estimaciones que se hacen de combustibles vivos. Esto se debe principalmente a que su evaluación implica llevar a cabo procesos destructivos. Es decir, se deben tomar muestras de campo, mismas que son procesadas en laboratorio para definir su peso seco. Para evitar esto se hace uso de las ecuaciones alómetricas, las cuales se han usado para la generación de tarifas (tablas de una sola entrada) de peso seco de combustibles vivos. Las cuales se basan en correlaciones univariadas del peso seco, con la altura o el diámetro de vegetación arbustiva. Sin embargo, no se ha probado un análisis multivariado. De acuerdo a esto, el propósito de este trabajo fue el generar una serie de tablas (doble entrada) de peso seco, basadas en un análisis multivariado. De esta forma se definieron ecuaciones de correlación entre peso seco con el diámetro y altura de los arbustos. Para esto se trabajó con vegetación arbustiva de la sierra de Tapalpa, Jalisco, de donde se colectaron muestras. Mismas que fueron procesadas en laboratorio, para obtener su peso seco. Posteriormente se definieron varios modelos de correlación, dentro de los cuales se seleccionaron los de mejor ajuste. En la mayoría de los casos, el ajuste fue mejor al incluir más de una variable. Con base a los cuales se estructuraron tablas de peso seco. Esta información será muy útil en la evaluación de combustibles forestales vivos, evitando la realización de todo el proceso descrito y la destrucción de material vegetativo.

Palabras clave: incendios forestales, protección forestal, tablas de peso seco.

REFERENCIAS

[1] Acosta-Mireles, M.; Vargas-Hernández, J.; Velázquez-Martínez, A.; Etchevers-Barra, J. D. 2002. Estimación de la biomasa aérea mediante el uso de relaciones alométricas en seis especies arbóreas en Oaxaca, México. Agrociencia, núm. noviembre-diciembre, pp. 725-736.

[2] Andariese, S.W; Covington, W. W. 1986. Biomass estimation for four common grass species in northern Arizona ponderosa pine. Journal of range management September 1986. 39(5).

[3] Basuki, T.M.; van Laake, P. E.; Skidmore, A. K.; Hussin, Y. A. 2009. Allometric equations for estimating the above-ground biomass in tropical lowland dipterocarp forests. Forest Ecology and Management 257: 1684–1694

CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS SUSTRATOS ORGÁNICOS, *Beta vulgaris ssp. Vulgaris* Y *Manihot esculenta*, MODIFICADOS POR MOLIENDA MECÁNICA.

[*1]Martínez-López, V., [2]Juarez-Arellano, E.A. y [3]Navarro-Martínez, A.K.

1. División de Estudios de Posgrado, Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, San Juan Bautista Tuxtepec, C.P. 68301, Oaxaca.
2. Instituto de Química Aplicada, Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, San Juan Bautista Tuxtepec, C.P. 68301, Oaxaca.
3. Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, San Juan Bautista Tuxtepec, C.P. 68301, Oaxaca.

*Autor para correspondencia: valeria.martz@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

La industria de la fermentación requiere de sustratos orgánicos abundantes, de baja demanda y bajos costos. Para generar los azucares reductores necesarios en el proceso de fermentación oscura resulta indispensable someter estos sustratos a pretratamientos como lo es la hidrólisis. Sin embargo, es importante la búsqueda de métodos alternativos de pretratamiento que minimicen tiempo y costos en los procesos fermentativos. En este sentido la molienda mecánica se ha usado para la modificación de diferentes variedades vegetales [1-2].En este trabajo se propone la molienda mecánica de alta energía para generar cambios fisicoquímicos en la estructura de sustratos orgánicos de baja demanda como son betabel (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*) y yuca (*Manihot esculenta*). Se partió de betabel y yuca deshidratados, posteriormente se realizó el pretratamiento por molienda mecánica de alta energía. Se utilizó un molino planetario de bolas a una velocidad fija de 600 rpm, tazones de 80 ml y 15 bolas de 10 mm de Fe, y a distintos tiempos de tratamiento (5, 10, 20, 30 y 40 minutos). Las muestras se caracterizaron fisicoquímicamente mediante las técnicas de TGA, DTA, DRX, IR y solubilidad. Se observaron cambios fisicoquímicos en las muestras a los diferentes tiempos. En los resultados mediante la difracción de rayos X se observó un aumento de la cristalinidad al incrementar el tiempo de molienda en las muestras de betabel, mientras que en las muestras de yuca la cristalinidad disminuye a mayores tiempos de molienda. Se realizó la cuantificación de azúcares reductores mediante la técnica de DNS. Se obtuvo mayores concentraciones de azúcares en las muestras de 5 y 40 minutos de molienda de betabel. En las muestras de yuca se observó la mayor concentración a los 30 minutos de molienda. El resultado de la prueba de solubilidad arroja que el mayor índice de solubilidad se alcanza a los 40 minutos con ambos sustratos (betabel y yuca). Con los resultados obtenidos se formulará un medio de cultivo modificado que pueda ser probado en la producción de hidrógeno a partir del proceso de fermentación oscura.

Palabras clave: Sustratos orgánicos; molienda mecánica; fermentación oscura.

REFERENCIAS

[1] Huang et al. 2008. Ball-milling treatment effect on physicochemical properties and features for cassava and maize starches. C. R. Chimie 11: 73-79.

[2] Levin, D. B.; Chahine, R. (2010). "Challenges for renewable hydrogen production from biomass". International Journal of Hydrogen Energy, 35 (10), p. 4962-4969.

BIOCONTROL DE TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) EN LA PAPA (*Solanum tuberosum*), CON EL HONGO *Trichoderma sp*.

*Hernández-Navarro, A., Sánchez-Ríos, J.L., Jiménez-Castañeda, V., Robles-Pinto, G. y Sánchez-Martínez, M.C.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco1, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán.

*Autor para correspondencia: angyphc@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Se evaluó el efecto antagónico in vitro de 3 cepas de Trichoderma spp. Sobre *Phytophthora infestans* agentes causal de Tizón tardío en el cultivo de papa. Se utilizó la técnica dual y 3 diferentes cepas de *Trichoderma spp* (viride, harzianum Colima y harzianum Michoacán) para la inhibición del crecimiento de Phytophthora infestans las 3 cepas fueron efectivas, ya que lograron inhibir el crecimiento del hongo *Phytophthora infestans* en diferentes porcentajes, pero la cepa con que logro inhibir el crecimiento del hongo *Phytophthora infestans*, fue *Trichoderma viride* presentando un 87% mientras que *Trichoderma harzianum* Colima y Michoacán presentaron un 69% y 71% respectivamente. En la interacción antagonista - patógeno en condiciones in vitro se concluye que el micoparasitismo posiblemente es el principal mecanismo de acción.

Palabras clave: Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*), papa (*Solanum tuberosum*), *Trichoderma spp.*

DETECCIÓN MOLECULAR DEL HEMOPLASMA *Candidatus Mycoplasma haemobos* EN GANADO BOVINO MEXICANO.

[1]Jaimes-Martínez, C.A., [2*]Quiroz-Castañeda, R.E., [2]Martínez-Ocampo, F., [1]Preciado de la Torre, J.F. y [1]Amaro-Estrada, I.

1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México.
2. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, México.
3. Laboratorio de Estudios Ecogenómicos, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

*Autor para correspondencia: quiroz.rosa@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

México es un país con una gran biodiversidad, lo cual propicia que una de las principales actividades económicas sea la ganadería. Entre los obstáculos más importantes para los programas de mejoramiento de la ganadería nacional están las enfermedades transmitidas por hemoplasmas. Los hemoplasmas que afectan al ganado bovino son: Mycoplasma wenyonii y Candidatus Mycoplasma haemobos. Esta última es una bacteria Gram negativa sin pared celular que se une a los eritrocitos y puede causar anemia, depresión, problemas reproductivos, mastitis, ictericia y cojeras [1]. Si bien no se ha observado un daño severo en los animales que la portan, se ha reportado que la combinación de dos o más hemoplasmas en un animal comprometen severamente su salud. Esto puede ser favorecido por coinfecciones y/o puede aumentar el potencial patogénico de hemoplasmas u otros agentes infecciosos [2]. Actualmente la presencia de Ca. Mycoplasma haemobos es diagnosticada por métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y secuenciación, ya que el diagnóstico por tinción de Giemsa en frotis sanguíneo es poco sensible y específico.

En México aún no se tienen reportes acerca de este hemoplasma en el ganado bovino, sin embargo, su estudio es de gran importancia debido a su asociación a ciertos cuadros clínicos [3]. En este trabajo se realizó la detección molecular de Ca. Mycoplasma haemobos mediante PCR utilizando como templado el DNA genómico extraído de sangre de bovinos de diferentes estados del país. Este hemoplasma fue detectado en animales de Durango, Morelos, Querétaro,Jalisco y Veracruz que en la mayoría de los casos también se encontraban infectados con Anaplasma marginale.

Palabras clave: hemoplasmas, diagnóstico molecular, *Mycoplasma haemobos.*

REFERENCIAS

[1] Girotto, A., Fonseca, A., Gomel, A., Sotero, A., Ferreira, G., García, J., Vilas, L., Welker, A. and Vidotto, O. (2012). Molecular detection and occurrence of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of Southern Brazil. 1st ed. Brasil, pp.p. 342-344.

[2] Meli, M.L, Willi, B., Dreher, U.M., Cattori, V., Knubben-Schweizer, G., Nuss, K., Braun, U., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2010. Identification, molecular characterization and occurrence of two

bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. J. Clin. Microbiol. 48, 3563-3568.

ESTUDIO DE VALORIZACIÓN DEL PELO DE DESECHO DE CURTIDURÍA PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN ALIMENTACIÓN AVÍCOLA.

*Mora-Maldonado, L.E., Padilla-Rizo, B., Maldonado-Santoyo, M. y Zitzumbo-Guzmán, R.

CIATEC A.C. Dirección de posgrado y capacitación. Posgrado Interinstitucional de Ciencia y Tecnología.

*Autor para correspondencia: lmora.picyt@ciatec.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La industria de la curtiduría en México se encuentra ubicada dentro de los 10 mayores productores de pieles a nivel internacional. Durante estos procesos se genera una cantidad considerable de desechos; por cada tonelada de cuero crudo procesado, se obtienen 200 kg de cuero acabado y el resto son residuos sólidos tales como pelo, carne y raspa. El pelo está constituido principalmente por queratina, una proteína que contiene 20 aminoácidos incluyendo 8 esenciales y esta proteína ha sido utilizada en diferentes sectores industriales tales como alimenticio, farmacéutico, cosmético, la industria de fertilizantes, biomateriales, etc. Derivado de esta área de oportunidad surgió la iniciativa de valorizar el pelo de desecho de los procesos de curtiduría para evaluar su potencial como insumo para la elaboración de un alimento alternativo para alimentación de aves. La metodología empleada a priori fue la recolección de muestras de tres lotes de pelo en una curtiduría en diferente fecha. Dichas muestras fueron secadas a temperatura ambiente, lavadas dos veces con agua de grifo a 60°C por 5 min y pulverizadas. El pelo fue caracterizado utilizando diferentes técnicas analíticas, instrumentales y microbiológicas aplicando métodos normativos. Con el fin de evaluar la calidad del proceso de lavado en la remoción de contaminantes presentes en el pelo, también se evaluó el agua efluente del lavado en los parámetros de DQO, sulfuros, grasas y aceites, sólidos totales, sólidos volátiles totales y sólidos sedimentables, así como pH y conductividad. Los resultados obtenidos para el pelo con el proceso propuesto fueron tamaño de partícula menor a 2 mm, humedad 8.38%, masa seca 91.62%, cenizas 4.68%, proteína cruda 73.31%, fibra cruda 2.04%, extracto etéreo 4.65%, digestibilidad 46.45%, mesófilos aerobios 550,000.

Palabras clave: Curtiduría; pelambre; valorización de residuos; alimento avícola.

REFERENCIAS

[1] Alzate-Tejada, A., & Tobon-Mejía, O. (2004). Manual de Producción mas limpia. Centro Nacional de Producción Más Limpia. Recuperado el 16 de 05 de 2015, de http://www.tecnologiaslimpias.org/curtiembres/manual.pdf

[2] Bautista, M. E., Pérez, L., García, M. T., Cuadros, S., & A., M. (2015). "Valorization of tannery wastes: Lipoamino acid surfactant mixtures from the protein fraction of process wastewater". Chem. Eng. Journal, 262, 399–408.

[3] Chojnacka, K., Górecka, H., Michalak, I., & Górecki, H. (2011). A review: "Valorization of keratinous materials". Waste Biomass Valor, 2, 317-321.

CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA Y EXPRESIÓN MOLECULAR DE UNA HEMOLISINA DE *Anaplasma marginale*.

[2]Millán-Hernández, A.D., [2,1*]Quiroz-Castañeda, R.E., [3]Martínez-Ocampo, F., [1]Cobaxin-Cárdenas, M. y [1]Rodríguez-Camarillo, S.

1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México.
2. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, México.
3. Laboratorio de Estudios Ecogenómicos, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

*Autor para correspondencia: quiroz.rosa@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Las hemolisinas son proteínas que producen lisis de los eritrocitos, mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática. Estas proteínas son consideradas factores de virulencia en Staphylococcus aureus, Vibrio parahemolyticus, Streptococcus pyogenes y en muchas otras bacterias patógenas. Existen 4 tipos de hemolisinas: Alpha, Beta, Gamma y Delta cada una con una actividad diferente. Estas pertenecen al grupo de las toxinas PFTs (Pore Forming Toxins) y están consideradas como toxinas RTX las cuales poseen nonapéptidos ricos en glicina, repetidos en tandem, en número distinto según el tipo. Su secreción se produce después del reconocimiento de una secuencia señal que está situada en el extremo C-terminal de la proteína (GGxGxDxxx), mediante la intervención de un sistema de secreción de tipo T1SS [3], dentro de este grupo se puede tener funciónes de proteasa, lipasa o incluso pueden actuar como bacteriocinas. En la Unidad de Anaplasmosis del CENID-PAVET se ha identificado una proteína anotada como hemolisina en el genoma de Anaplasma marginale, una bacteria intracelular obligada, para la cual no se ha descrito ninguna hemolisina. En este trabajo se realizó la caracterización de la proteína mediante análisis bioinformáticos. En principio, se realizó un Blast de la secuencia proteica, y de este análisis se evidenció el porcentaje de similitud con proteínas reportadas como transportadores de iones, proteínas hipotéticas y hemolisinas de bacterias como Erlichia o Wolbachia, obteniendo porcentajes desde 37% hasta 65% para hemolisinas de estas últimas bacterias mencionadas. La búsqueda de dominios funcionales se hizo con el buscador de dominios conservados del NCBI y se encontró que posee dominios TlyC, CorC_HlyC, GldE, PRK15094, además de un dominio CBS, reportado en transportadores de iones. Además de esto se realizó un análisis de epítopos tipo B con el programa SVMTrip en el cual se obtuvieron 6 potenciales epítopos, posteriormente se predijo si la hemolisina tenia potencial como proteína virulenta con el programa VirulentPred, en donde se obtuvo un valor alto de score de 0.8478 siendo 1 el mayor resultado. También se realizó una análisis de predicción de péptido señal con el programa SignalP. Para identificar a qué grupo de hemolisinas pertenece la hemolisina de A. marginale se hicieron alineamientos con secuencias de hemolisinas de los cuatro tipos, Alfa, Beta, Gamma y Delta y se encontró que la mayoría de las hemolisinas tipo C, contienen dominios del tipo tlyC como el identificado en la hemolisina de A. marginale. Este resultado se confirmó mediante una reconstrucción filogenética con el programa MEGA7. Por otro lado, también se hizo el modelado

tridimensional con el programa de I-TASSER usando el templado de una hemolisina de Oenococcus oeni y el de un transportador de Mg2+ y cobalto con dominio CorC.> Se pretende evaluar también la actividad hemolítica mediante la expresión recombinante de la proteina en Pichia pastoris.

Palabras clave: Curtiduría; pelambre; valorización de residuos; alimento avícola.

REFERENCIAS

[1] Vazquez, R. F. (2015). Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de Escherichia coli. Buenos Aires , Argentina.

[2] Wiseman, G. M. (1975). The Hemolysins of Staphylococcus aureus. Bacteriological review, 317-344.

[3] Ladislav Bumba, J. M. (2016). Calcium-Driven Folding of RTX Domain b-Rolls,Ratchets Translocation of RTX Proteins through, Type I Secretion Ducts. Mollecular Cell, 47-62.

EVALUACIÓN DE VARIEDADES DE TRIGO CRISTALINO Y HARINERO EN EL NORTE DE SINALOA.

[1*]Borbón-Gracia, A., [2]Macías-Cervantes, J., [3]Armenta-Osuna, P. y [4]Villaseñor-Mir, H.E.

1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Norman E. Borlaug. Norman E. Borlaug Km. 12, Valle del Yaqui, Obregón, México 85000
2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle del Fuerte. Km. 1609 Carretera Internacional México-Nogales, Guasave, México 81110.
3. Auxiliar de investigación Campo Experimental Norman E. Borlaug. Norman E. Borlaug Km. 12, Valle del Yaqui, Obregón, México 85000
4. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. Carretera Los Reyes-Texcoco, km 13.5, Texcoco, México 56250.

*Autor para correspondencia: borbon.alberto@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN
Entre 2011 y 2013 la superficie promedio nacional dedicada a trigo alcanzó 660 mil hectáreas, con un volumen de producción de 3.4 millones de toneladas anuales. En el estado de Sinaloa, durante el ciclo otoño-invierno 2014-2015 y 2015-2016 se establecieron alrededor de 79,384 y 74366 hectáreas de trigo respectivamente, siendo las variedades más sembradas Kronstad F2004, Tacupeto F2001 y Onavas F2009, todas ellas susceptibles a royas. Dada la importancia que representa este cultivo, es muy importante contar con un mayor abanico de variedades, de ahí que el objetivo del presente trabajo fue validar tres variedades de trigo cristalino y tres variedades de trigo harinero. La siembra se realizó en seco el 05 de diciembre de 2016 en camas de 80 cm de ancho a doble hilera, utilizando 100 kg/ha de semilla, posteriormente se aplicó el riego de nacencia, se fertilizó con la fórmula 241-52-00. Se aplicaron tres riegos de auxilio y u na aplicación para el control de pulgón de la hoja, para determinar el rendimiento de grano se cosecho el total de la parcela con una trilladora combinada. Sobresalieron las variedades Borlaug 100 F2014, Conatrigo F2015 y Barobampo C2015 con rendimientos que van de 6,450 a 6,960 kg/ha^{-1}.

Palabras clave: Rendimiento; genotipos; calidad; tolerancia.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de trigo (*Triticum durum y Triticum aestivum*) en México alcanza un valor de 12 mil mdp, cifra que le coloca como el 10º cultivo más importante, al contribuir con el 2.9% del valor de la producción agrícola. Entre 2011 y 2013 la superficie promedio nacional dedicada al cereal alcanzó 660 mil hectáreas, con un volumen de producción de 3.4 millones de toneladas anuales (SIAP 2015) [1]. En el estado de Sinaloa, durante el ciclo otoño-invierno 2014-2015 y 2015-2016 se establecieron alrededor de 79,384 y 74366 hectáreas de trigo respectivamente [2], de las cuales en su mayoría corresponden a trigo harinero, siendo las variedades Kronstad F2004, Onavas F2009 y Villa Juárez F2009 las que predominan en el estado, dichas variedades fueron generadas para el estado de Sonora y ya perdieron su resistencia a royas. De ahí la importancia de validar nuevas variedades de trigo cristalino y harinero resistentes a royas que se pudieran adaptar a las condiciones agroclimáticas de norte de Sinaloa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo durante el ciclo otoño-invierno 2016-2017 dentro de los terrenos de la Universidad Autónoma de Sinaloa en el Valle del Carrizo, ubicado en la carretera Internacional Los Mochis-Navojoa, km 55.5, frente al poblado de El Carrizo, Sinaloa. Se evaluaron tres variedades de trigo harinero y tres de trigo cristalino, todas liberadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), los materiales evaluados fueron:

1) KRONSTAD F2004 (Testigo harinero)
2) BORLAUG 100 F2014
3) CONATRIGO F2015
4) CIRNO C2008 (Testigo cristalino)
5) BAROBAMPO C2015
6) CONASIST C2015

Estos materiales se establecieron en un arreglo en franjas, el tamaño de parcela constó de ocho surcos a 80 centímetros de separación por 100 metros de longitud para cada variedad (640 m^2), la siembra se realizó en seco el día 05 de diciembre de 2016 con una sembradora convencional, se sembró en camas de 80 cm a doble hilera, con una separación entre hileras de 25 cm y con una densidad de siembra de 100 kg/ha de semilla, al cultivo se le aplicaron el riego de nacencia y tres riegos de auxilio, se fertilizó con la fórmula 241-52-00 de N-P-K aplicando todo el fosforo y la mitad del nitrógeno en presiembra y el resto del nitrógeno antes del primer riego de auxilio, alrededor de los 25 días después de la siembra se realizó una aplicación de herbicidas para el control de malezas de hoja ancha.

Se tomaron datos agronómicos de altura de planta, reacción a enfermedades, días a floración, acame y madurez fisiológica. Para evaluar el rendimiento de grano se cosechó el total de la parcela (640 m^2) con una trilladora combinada, por ser un solo dato de rendimiento no se realizaron análisis estadísticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se presentan los rendimientos de grano y características agronómicas de las variedades de trigo cristalino, donde se puede observar que la variedad Barobampo C2015 presentó el mayor rendimiento de grano, además de resistencia a roya de la hoja y roya amarilla comparado con la variedad testigo CIRNO C2008 que también presentó buen rendimiento de grano pero fue susceptible a royas, las cuales no afectaron el rendimiento de grano por presentarse en una etapa avanzada del cultivo (llenado de grano), como lo menciona Figueroa [3].

Cuadro 1.- Rendimiento y características agronómicas de tres variedades de trigo cristalino validadas en el Valle del Carrizo, Sinaloa ciclo O-I 2016-17.

Variedad	Días a floración	Días a madurez fisiológica	Altura de planta	kg/ha
BAROBAMPO C2015	66	110	84	6520
CIRNO C2008	67	110	77	6430
CONASIST C2015	71	107	85	6295

En el Cuadro 2 se presentan los rendimientos de grano y características agronómicas de las variedades de trigo harinero, donde se puede observar que la variedad Borlaug 100 F2014 presentó el mayor rendimiento de grano seguida por la variedad Conatrigo F2015, estas variedades también presentaron resistencia a roya de la hoja y roya amarilla, mientras que la variedad más sembrada por los productores del Valle del Carrizo Kronstad F2004 presentó el menor rendimiento de grano además de susceptibilidad a royas.

Cuadro 2.- Rendimiento y características agronómicas de tres variedades de trigo harinero en el Valle del Carrizo, Sinaloa ciclo O-I 2016-2017

Variedad	Días a floración	Días a madurez fisiológica	Altura de planta	kg/ha
BORLAUG 100 F2014	72	109	90	6960
CONATRIGO F2015	72	108	95	6447
KRONSTAD F2004	75	110	98	6003

CONCLUSIONES

El INIFAP cuenta con nuevas variedades de trigo cristalino y harinero que superan en rendimiento de grano y resistencia a enfermedades a las variedades que se siembran actualmente en el norte de Sinaloa.

La variedad de trigo cristalino Barobampo C2015 es la mejor opción para los productores de trigo cristalino del norte de Sinaloa, mientras que las variedades Borlaug 100 F2014 y Conatrigo F2015 son las mejores opciones para la producción de trigo harinero, ya que estas variedades superan en rendimiento y resistencia a enfermedades a las variedades que actualmente se siembran en el norte de Sinaloa.

REFERENCIAS

[1] SIAP. 2015. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), México. http://www.siap.gob.mx.

[2] SIAP. 2016. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), México. http://www.siap.gob.mx.

[3] Figueroa L. P., G. Fuentes D., J. M. Cortés J., L. M. Tamayo E., P. Félix V., J. E. Ortiz E., I. Armenta C., V. Valenzuela H. G. Chávez V. y J.L. Félix F. 2011. Guía para producir trigo en el sur de Sonora. Folleto para productores N° 39. Cd. Obregón, Sonora, México. pp 26.

PROBADORES DE LÍNEAS DOBLE HAPLOIDES DE MAÍZ AMARILLO CON ALTO CONTENIDO DE ACEITE EN EL NORTE DE SINALOA.

[1*]Peinado-Fuentes, L.A., [2]Cubedo-Ruíz, E.A., [1]Llaven-Valencia, G., y [3]Preciado-Ortiz, R.E.

1. INIFAP – Campo Experimental Valle del Fuerte, Guasave, Sinaloa, México.
2. INIFAP – Campo Experimental Norma E. Borlaug, Cd. Obregón, Sonora, México.
3. INIFAP – Campo Experimental del Bajío, Celaya, Guanajuato, México.

*Autor para correspondencia: peinado.luis@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Los cruzamientos de prueba son utilizados para estimar los efectos genéticos de las poblaciones en mejoramiento y la información analizada es valiosa para definir patrones heteróticos, los cuales constituyen una fuente de germoplasma para la generación de líneas élite de gran utilidad en el mejoramiento genético. La tecnología de producción de líneas haploide duplicados (HD) en el mejoramiento de maíz, está basada en la inducción de haploidía in vivo, es reconocida a nivel mundial como un importante medio para aumentar la eficiencia del mejoramiento. Por lo tanto, al tener líneas DH con alto contenido de aceite es posible la producción de híbridos con alto contenido de aceite, un mercado viable para los productores de maíz. La elección apropiada del germoplasma constituye la mitad del éxito de una hibridación, así las líneas que se recobren sean superiores a las poblaciones existentes, aplicando los conceptos de aptitud combinatoria general (ACG), específica (ACE) y porcentaje de heterósis (H). El presente trabajo se realizó en el Campo Experimental Valle del Fuerte del INIFAP durante el ciclo OI 2016-2017 donde se evaluaron las cruzas experimentales de maíz amarillo de líneas CML´s del CIMMYT y líneas HD con alto contenido de aceite como probadores, para la región del norte de Sinaloa. El manejo agronómico fue con base a la guía técnica de maíz del INIFAP. La estimación de la ACG y ACE fue mediante el diseño II de Carolina del Norte. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat V3.0. Para los efectos de ACG y ACE, la cruza CML451XCML481XPAN139, con un efecto positivo al tener un rendimiento de 11,498.2 kg ha-1. En cuanto a la relación ACG/ACE los efectos aditivos y no aditivos fueron de similar importancia, donde el rendimiento fue de naturaleza no aditiva y la expresión de heterosis respecto al promedio de los progenitores fue superior al 100% en las cruzas más sobresalientes, es así, que la línea PAN139 puede ser usada como probador ya que participa en los pares heteróticos con mayor RG y presenta una buena ACG. Finalmente, todas las líneas evaluadas y sus respectivas cruzas experimentales tuvieron un buen desempeño en la región del norte de Sinaloa, con un clima subtropical.

Palabras clave: Mejoramiento; Haploide duplicado; Rendimiento.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético de maíz se fundamenta en la explotación de la heterósis o vigor híbrido, fenómeno que ocurre principalmente cuando se cruzan dos líneas totalmente homocigóticas y el híbrido resultante presenta un valor agronómico mayor que lo esperado, si se considera solo la media

aritmética de las líneas parentales [1, 2]. Las líneas totalmente parentales o líneas homocigóticas se obtienen mediante la tecnología "haploide duplicados" (DH), es un genotipo que se forma cuando las células (n) de un haploide experimentan un proceso, espontaneo o inducido artificialmente de duplicación cromosómica (2n). La tecnología DH en el mejoramiento de maíz, está basada en la inducción de haploidía in vivo es reconocida a nivel mundial como un importante medio para aumentar la eficiencia del mejoramiento (Figura 1). Esta tecnología fue adoptada en Europa Norteamérica y más recientemente en China [2, 3].

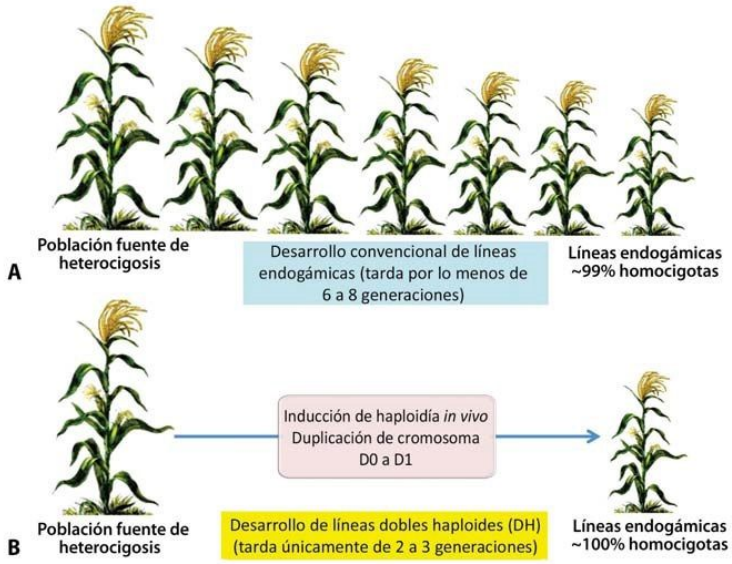


Figura 1.- Número de generaciones requeridas para obtener pureza genética (homocigosis) por medio de (A) endogamia convencional; (B) tecnología doble haploides.

Las líneas haploide duplicados son evaluadas mediante cruzamientos dialélicas, los cuales permiten estimar los efectos genéticos de las poblaciones en mejoramiento y la información analizada es valiosa para definir patrones heteróticos, los cuales constituyen una fuente de germoplasma para la generación de líneas élite de gran utilidad en el mejoramiento genético, la elección de germoplasma es una de las decisiones más importantes que el mejorador debe tomar ya que puede ser determinante para el mejoramiento del maíz, incluye dos componentes de igual importancia, 1) elección de germoplasma, y 2) desarrollo de líneas para su uso en híbridos [4, 5]. La elección apropiada del germoplasma constituye la mitad del éxito de una hibridación, así como la elección de una fuente de germoplasma apropiada, implica tener el conocimiento del patrón heterótico al que pertenece, sin embargo, los requisitos más importantes para una buena población como fuente para extraer líneas son un alto comportamiento promedio y varianza genética adecuada, de tal manera que las líneas que se recobren sean superiores a las poblaciones existentes, aplicando los conceptos de aptitud combinatoria general y específica [6]. La aptitud combinatoria general (ACG) proporciona información sobre que líneas puras deben producir los mejores híbridos cuando se cruzan con muchas otras líneas, así mismo se ha definido como el valor medio F1' s de sus cruzas con otras líneas, en otras palabras, es el comportamiento promedio de una línea en sus combinaciones híbridas, y la aptitud combinatoria específica (ACE) determina ciertas

combinaciones híbridas específicas que se expresan favorablemente o no, con respecto al comportamiento promedio de sus progenitores [7, 8]. El diseño II de Carolina del Norte con efectos fijos, permite hacer cruzamientos entre dos poblaciones diferentes propuesto por (Comstock y Robinson 1948), y se ha utilizado con éxito en la estimación de los efectos de aptitud combinatoria general (ACG) de los individuos empleados como progenitores, y los efectos de aptitud combinatoria específica (ACE) de la progenie evaluada [9].

Por lo tanto, al tener líneas DH con alto contenido de aceite es posible la producción de híbridos con alto contenido de aceite. Se consideran híbridos de maíz con alto contenido de aceite, aquellos en los que la cantidad de aceite fluctúa entre 7% y 8%, mientras que el maíz común contiene en promedio 4.0% a 4.5%. En los híbridos de maíz común, el contenido de aceite en el germen es de 30%, mientras que en los de alto contenido de aceite es del 50% [9, 10]. A partir de 1908, se valora al maíz oleoso como alimento humano y para uso pecuario, convirtiéndose el germen, que era un producto casi de deshecho, en uno de los subproductos del proceso de industrialización que proporciona valor agregado en la actualidad por su contenido de aceite. Este aceite tiene elevada demanda en la elaboración de margarina, aceites para aderezo, para cocinar y para una gran diversidad de productos alimenticios [12]. A partir de 1960, su uso pecuario para mejorar las dietas animales, ha recibido más atención. En ganado lechero, el alimento con grano de maíz con mayor contenido de aceite contribuye al incremento diario de 1.25 kg de leche, comparado con el forraje convencional [13, 14]. En la alimentación de aves, el maíz con alto contenido de aceite puede desplazar varias o todas las fuentes energéticas, como son las grasas comerciales y el maíz convencional; a las fuentes de proteína y aminoácidos como la harina de soya entre otras, disminuyendo los costos del alimento y los costos totales de producción, permitiendo la elaboración de dietas con mayor densidad nutrimental y más eficiencia productiva [15, 16]. El grano del maíz constituye un depósito de energía vital renovable, al que día con día se le incrementa la extraordinaria diversidad de usos en la alimentación humana y animal, y en numerosos productos de las industrias de la masa y la tortilla, de la harina nixtamalizada, farmacéutica, cosmética, de plásticos biodegradables, de adhesivos, de jarabes, cervecera, del almidón, del alcohol, y entre muchas otras del aceite y sus derivados siendo un mercado viable para los productores del noroeste de México [15, 16, 17].

En este trabajo se estimó aptitud combinatoria general de líneas de maíz y la aptitud combinatoria específica de sus cruzas mediante el diseño II de Carolina del Norte y porcentaje de heterósis respecto al promedio de los progenitores y se identificó a las mejores combinaciones híbridas con alto contenido de aceite para el norte del estado de Sinaloa en el ciclo otoño invierno 2016 – 2017.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del material

Las líneas doble haploides utilizadas en el presente trabajo fueron originadas de la Población Amarilla del Noroeste (PAN) y una Población Amarilla del Bajío (PAB) como probadores y algunas CML´s del CIMMYT como hembras (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Genealogía de líneas progenitoras

GENEALOGÍA	
CML451X481 [3]	PAB209 [1]
CML451X486 [3]	PAB236 [1]
CML486 [3]	PAN139 [1]
PAN142 [2]	PAN141 [2]
	PAN142 [2]
	PAN144 [2]
	PAN146 [2]

[1] Población Amarilla del Bajío (PAB), [2] Población Amarilla del Noroeste (PAN), [3] Líneas del CIMMYT

Obtención de nuevas líneas doble haploides (DH)

Las líneas DH de maíz blanco y amarillo utilizadas en este trabajo se obtuvieron durante el ciclo 2012 – 2013, en coordinación con el CIMMYT, la metodología para la obtención de líneas haploide duplicado está basada en lo publicado por Prasanna *et al.* (2013), la cual, consiste dos etapas en general, la inducción de haploidía, se requiere una línea o población donadora de genes que se cruza mediante un inductor de haploidía lo que produce granos en una mazorca con segregación de granos diploides (2n) y una cierta fracción de granos haploides (n). Los granos con un embrión haploide tienen un endospermo triploide regular (3n) y, por tanto, su capacidad de germinación es similar a la de los granos que tienen un embrión diploide. Al seleccionar los granos haploides por reconocimiento visual, se debe realizar una duplicación cromosómica. La segunda etapa es la duplicación cromosómica: al utilizar la colchicina como agente duplicador de cromosomas (o inhibidor mitótico) en la producción de DH, ya que la duplicación espontanea de cromosomas ocurre a una tasa muy baja.

Evaluación de cruzas experimentales

Las cruzas experimentales se evaluaron durante el ciclo OI 2016 – 2017 en el Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF) del INIFAP, utilizando lotes de 2 surcos de 5 metros de longitud con espacio de 0.8 m con una densidad de 7 – 8 plantas por metro, previa preparación de terreno como rastreo, barbecho y fertilización del suelo NPK (126-52-00) y marca siembra, herbicida pre-emergente, monitoreo y control de plagas y enfermedades y fertilización complementaria y riegos de auxilio, toma de datos y cosecha, los datos a registrar fueron, registro de días a floración femenina y días a floración masculina, reacción a plagas y enfermedades, rendimiento de grano, altura de planta, registro de acame, plantas cosechadas, cantidad de mazorcas cosechadas y mal cubiertas, determinación del porcentaje de humedad, registro del color y textura del grano.

Análisis de Aptitud Combinatoria General (ACG) y Aptitud Combinatoria Específica (ACE)

Los efectos de la ACG sobre el rendimiento de grano y sus componentes pueden ser evaluados mediante una prueba de t. Debido a que los valores de la ACG y ACE van numéricamente de –X a +X, se utilizó el 0 como valor de referencia contra el cual se pueden llevar a cabo las comparaciones. De esta forma se determina estadísticamente cuales líneas y cruzas especificas son significativamente superiores en relación a la ACG y ACE respectivamente (Wong Romero et al., 2007). Debido a que diversas hipótesis son probadas simultáneamente en este análisis, el valor de p es ajustado mediante el método FDR (por sus siglas en inglés, false discovery rate) para evitar cometer el error estadístico tipo I.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental al azar con ocho repeticiones y se realizó un análisis de varianzas de bloques por repetición bajo el análisis estadístico de ANOVA y prueba de Tukey (0.05) en el software InfoStatv3.0 [10].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza en la comparación del rendimiento de grano en relación a la madre, padre y cruzas experimentales de líneas doble haploide de maíz amarillo, se presenta en el Cuadro 2 con diferencias altamente significativas tanto en madre como en padre y una diferencia significativa para las cruzas.

Cuadro 2. Significancia de cuadrado medio para el rendimiento de grano de las líneas usadas como madre, padre y sus cruzas HD de maíz amarillo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Madre	3	41880940	13960313	13.4921	4.115e-07 ***
Padre	6	66716730	11119455	10.7466	1.454e-08 ***
Cruza	8	19421228	2427653	2.3462	0.02633 *
Residuals	74	76567736	1034699		

Las diferencias se atribuyen a la diversidad genética de los materiales evaluados, ya que los efectos son de naturaleza aditiva, la combinación de la carga genética tanto de la madre como del padre permitieron una varianza genética muy buena, por lo tanto, tanto las líneas empleadas como madres y padre tiene un fondo genético muy diverso permitiendo obtener una mayor ACG de todos los materiales.

Los valores de la ACG del rendimiento de grano y sus componentes estimados para cada se puede observar que dos de los genotipos mostró efectos de ACG significativos en el rendimiento de grano. El probador PAN139 (1350.65) y PAN142 (480.29), registraron valores positivos y significativo de ACG, mientras que todos los demás probadores registraron valores ACG negativos (Figura 1).

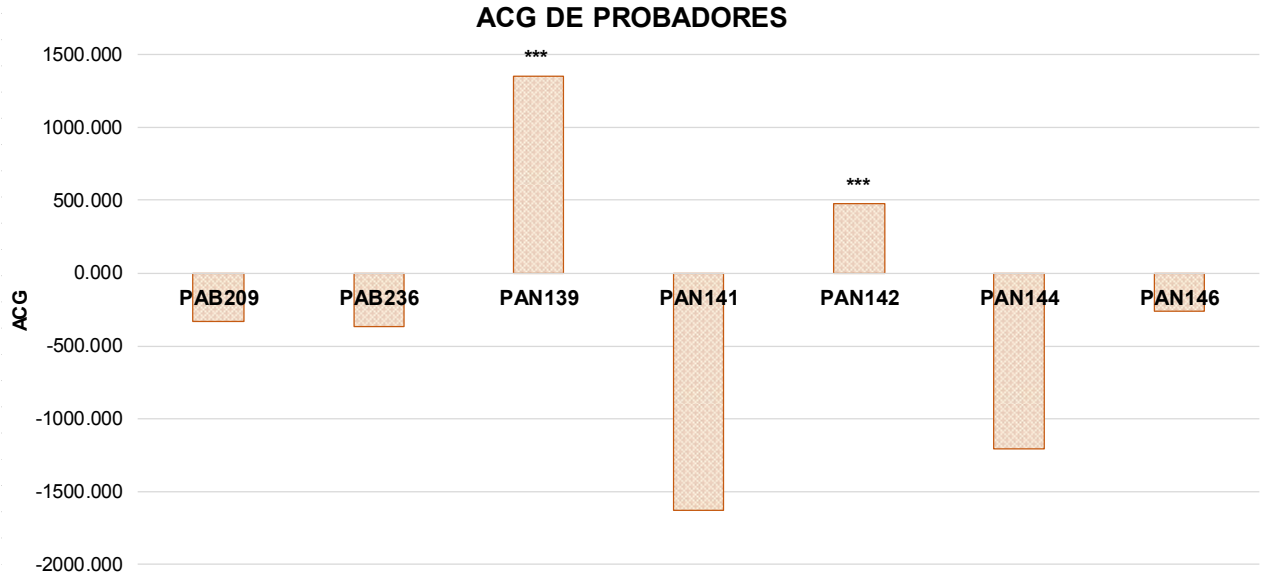


Figura 1.- Muestra la ACG de cada uno de los probadores

La dirección del efecto de ACG del rendimiento de grano, fue determinada por el número de componentes que registraron efectos de ACG en la misma dirección (positiva o negativa). Las líneas PAN139 y PAN142 fueron los genotipos que presentaron una relación positiva de la ACG en la mayoría de los componentes de rendimiento con respecto al efecto positivo de la ACG del rendimiento de grano. Opuesto a estos resultados se encontraron las líneas PAB209, PAB236, PAN141, PAN144 y PAN146, que manifestaron una relación negativa de la ACG en todos los componentes, sin embargo, esto no significa que visiblemente influyó en la baja ACG de la productividad de grano en sus combinaciones hibridas.

En total 21 cruzas registraron efectos positivos y significativos de Aptitud Combinatoria Específica (ACE), de estos cruzamientos, correspondieron a los realizados con todos los probadores, 3 cruzas con los probadores PAB236, PAN141 y PAN146 y con la hembra CML451X481 registraron datos negativos en cuanto a su ACE (Figura 2).

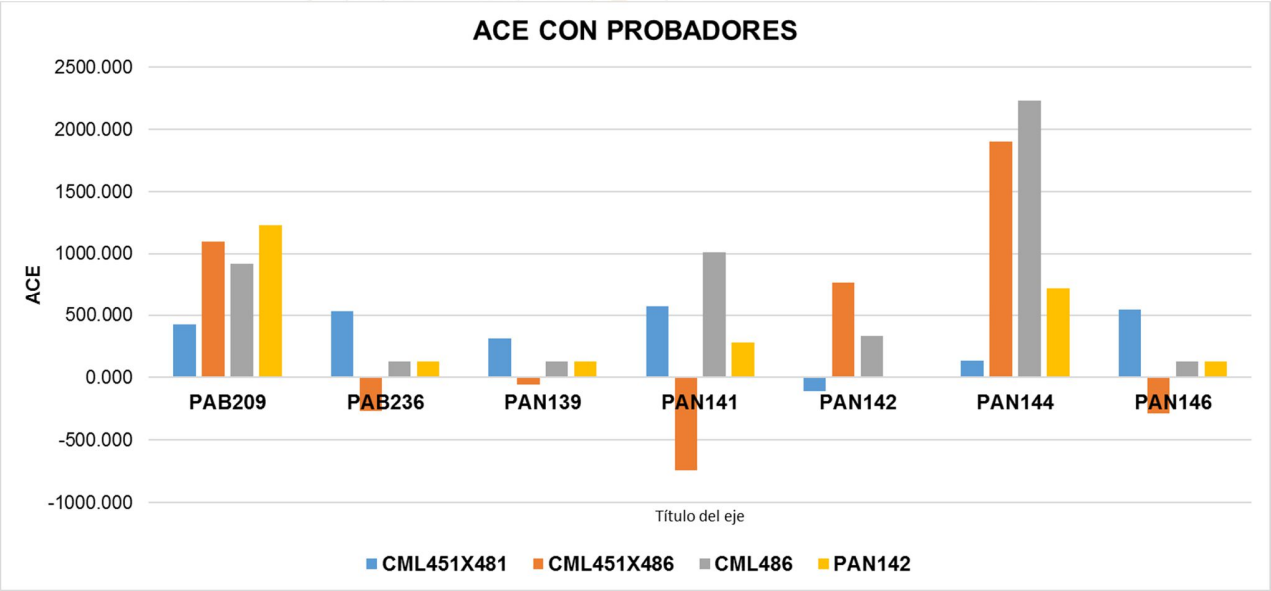


Figura 2.- Muestra la ACE de cada uno de los probadores

Tabla 1.- Muestra el análisis de Diferencia Mínima Significativa (α = 0.05) para el rendimiento de grano de las cruzas experimentales de maíz amarillo más sobresalientes.

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1391.46257
Error: 1105495.9359 gl: 86

CRUZA	Medias	n	E.E.					
TESTIGO	11509.2	4	525.7	A				
CML 451X481 XPAN 139	11498.21	4	525.7	A				
CML 451X486 XPAN 139	10990.95	4	525.7	A	B			
CML 451X486 XPAN 142	10901.52	8	371.7	A	B			
CML 486 XPAB 235 3R	10786.58	4	525.7	A	B			
CML 486 XPAN 138 3R	10617.7	4	525.7	A	B	C		
CML 451X486 XPAB 209	10465.07	4	525.7	A	B	C	D	
CML 451X481 XPAN 142	10167.11	8	371.7	A	B	C	D	
CML 451X481 XPAN 146 3R	10118.79	4	525.7	A	B	C	D	E

CML 451X481 XPAB 236 3R	9991.35	4	525.7	B	C	D	E				
CML 451X486 XPAN 144	9977.71	4	525.7	B	C	D	E				
CML 486 XPAN 144	9933.59	8	371.7	B	C	D	E				
CML 451X481 XPAB 209	9931.42	8	371.7	B	C	D	E				
CML 451 XPAN 138 3R	9837.78	4	525.7	B	C	D	E				
CML 451X486 XPAN 146	9146.56	4	525.7		C	D	E	F			
CML 451X486 XPAB 236	9056.03	4	525.7			D	E	F			
CML 451X481 XPAN 141	8777.66	8	371.7				E	F			
CML 486 XPAN 141	8703.95	4	525.7				E	F	G	I	
CML 451X481 XPAN 144	8347.91	4	525.7					F	G	I	
PAN 142 XPAB 209	8295.63	4	525.7					F	G	I	
CML 451X486 XPAN 141	7328.56	4	525.7						G	H	I	J
PAN 142 XPAN 144	6496	4	525.7							H	I	J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

La respuesta de una combinación híbrida (cruzamiento) es consecuencia de la heterosis, ésta depende de la diferencia en frecuencia génica y de la dominancia entre alelos de los padres incluidos en el cruzamiento, potencializando el vigor híbrido, expresando todas las características dominantes en una sola generación. Del total de cruzas experimentales que obtuvieron valores positivos y significativos de ACE, se identificó una cruza superior (Tabla 1) con rendimientos de grano de 11.5 ton ha $^{-1}$ (CML 451X481 XPAN 139) que presento una ACE 314.34, aunque no presenta un alto valor de ACE, no hay diferencia significativa en el rendimiento de grano con respecto al testigo comercial. En cuanto a 7 cruzas experimentales tiene un rendimiento competitivo si consideramos un rendimiento de 10.0 ton ha^{-1}, es competitivo para el estado de Sinaloa.

CONCLUSIONES

- Se sabe que algunas líneas endogámicas tienen capacidad para combinarse con múltiples líneas diferentes y producir progenie híbrida de alto rendimiento [4, 5, 6] . Este fue el caso de 2 probadores HD de maíz amarillo (PAN139 y PAN142) que generaron rendimientos de grano significativamente superiores en sus combinaciones con dos hembras (CML 451X481, CML 451X486). Este comportamiento se atribuye a que las líneas involucradas obtuvieron efectos

altos de ACG, tal y como se ha reportado en otros estudios, donde se ha evaluado la ACG en cruzamientos de prueba [12, 14]. Por lo tanto, en dichas líneas hay una mayor presencia del tipo de acción genética de aditiva en sus cruzamientos. Es decir, que ninguno de los genotipos resulto dominante en la hibridación, ya que en estos casos los genotipos involucrados contribuyeron en igual medida en la productividad del grano.

- La ACE permite la identificación de cruzas específicas altamente productivas, donde los efectos genéticos que dictan el buen comportamiento de cruzas específicas son de tipo no aditivo [4, 5, 6]. De las 25 cruzas experimentales generadas y evaluadas en el presente trabajo, 21 manifestaron efectos positivos y significativos de ACE con los diferentes probadores. Sin embrago, se pudo apreciar que la mayoría de las cruzas no registraron los rendimientos más altos de grano. Estos resultados se deben a la alta ACG causada por las líneas (hembras) y a la buena ACE obtenida por la interacción entre machos y hembras (cruzas M x H). Esto se vio reflejado en los valores de los cuadrados medios arrojados por el ANOVA a través del diseño II de Carolina de Norte, los cuales fueron altos y significativos para hembras y la interacción M x H.

- Debido a la alta relación positiva entre la ACG mostrada en el rendimiento de grano y los diversos componentes del rendimiento analizados, las líneas PAN139 y PAN142 podrían ser destinadas directamente a la generación de nuevos híbridos en el programa de mejoramiento de maíz.

- La ventaja del uso de cruzas DH es el menor tiempo utilizado en la generación de líneas puras para los programas de mejoramiento.

REFERENCIAS

[1] S. Gao, C. Martinez, D. J. Skinner, A. F. Krivanek, J. H. Crouch and Y. Xu. "Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize", Molecular Breeding, 22(3): 477-494. 2008.

[2] D. S. Falconer. "Introducción a la genética cuantitativa" (8 ed). México, D.F.: Ed. CECSA, 430. 1986.

[3] J. Bordes, R. Charmet, M. Dumas de Vaulx, M. Pollacsek, A. Beckert and A. Gallais. "Doubled haploid versus single-seed descent and S1-family variation for testcross performance in a maize population", Euphytica, 154: 41-51. 2007.

[4] P. G. De la Cruz, De la Cruz, N. G. Castañón, O. R. Osorio, M. N. Brito, R. Lozano and N. U. López. "Aptitud combinatoria general y específica de germoplasma tropical de maíz". Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10(1), 101-107. 2009.

[5] M. Fuentes, J. L. Quemé and C. Pérez. "Nota técnica efectos de aptitud combinatoria general e identificación de híbridos triples de maíz (Zea maysl) grano blanco". Programa regional de maíz (PRM). Agronomía Mesoamericana, 4, 71-76.1993.

[6] S. González, H. Córdova, S. Rodríguez, H. De León and V. M. Serrato. "Determinación de un patrón heterótico a partir de la evaluación de un di alelo de diez líneas de maíz subtropical". Agron Mesoam, 8, 1-7. 1997.

[7] C. P. Guillen, L. E. De la Cruz, N. G. Castañón, O. R. Osorio, M. N. Brito, R. Lozano and N. U. López. "Aptitud combinatoria general y específica de germoplasma tropical de maíz". Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10(1), 101-107. 2009.

[8] R.E Preciado, A.D Terrón, N. O. Gómez and E. I. Robledo. "Componentes genéticos en poblaciones heteróticamente contrastantes de maíz de origen tropical y subtropical". Agronomía Mesoamericana, 2(16), 145-151. 2005.

[9] AACC. "Corn Chemistry and Technology". (1 ed). St. Paul, Minn., USA.: American Association of Cereal Chemists, 315. 1987.

[10] B. M. Prasanna, V. Chaikam AND G. Mahuku. "Tecnología de dobles haploides en el mejoramiento de maiz: teoria y práctica". CIMMYT. 2013

[11] G. Poneleit and L. Bauman. "Diallel analysis of fatty acids in corn oil", Crop Sci., 10: 338-341.1970.

[12] A. De la Rosa, H. De León, F. Rincón and G. Martínez. "Efectos genéticos, heterósis y diversidad genética entre híbridos comerciales de maíz adaptados al bajío mexicano", Rev. Fitot. Mex., 29(3): 247-254. 2006.

[13] G. Andrae, W. Hunt, K. Duckett, R. Kennington, P. Feng, N. Owens and S. Soderlund. "Effect of high-oil corn on growth performance, diet digestibility, and energy content of finishing diets fed to beef cattle", Journal of animal science, 78(9):2257-2262. 2000.

[14] M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J. A. Di Rienzo and C.W. Robledo. "Infostat". Manual del Usuario (1 ed.). Córdoba, Argentina.: Editorial Brujas, 350. 2008.

[15] R. Wong, E. Gutiérrez, A. Palomo, S. Rodriguez, H. Cordova, A. Espinoza and J. J. Lozano. "Combining ability for yield components in grain corn lines at la comarca lagunera, Mexico".2007

[16] C. Guerrero, A. Espinoza, A. Palomo, E. Gutiérrez, H. Zermeño and G. "Aptitud combinatoria del rendimiento y sus componentes en dos grupos de líneas de maíz". Agronomía Mesoamericana, 22(2), 257-267. 2011.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA ROYA EN FRAMBUESA (RUBUS IDAEUS L.) ORGÁNICA BAJO APLICACIONES DE *Trichoderma spp*.

[1*]Chan-Cupul, W., [1]Marín-Cortez, F., [1]Manzo-Sánchez, G., [1]Hernández-Ortega, H.A., [1]Buenrostro-Nava, M.T. y [2]Galindo-Velasco, E.

1. Universidad de Colima, Laboratorio de Control Biológico, Km 43 Autopista Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, C.P. 28934.
2. Universidas de Colima, Facultad de Veterinaria, Km 40 Autopista Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, C. P. 28934.

Autor para correspondencia: wchan@ucol.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

EL objetivo del presente estudio fue evaluar la idoneidad de dos cepas nativas de Trichoderma spp. para el control biológico de la roya en la producción de frambuesa (Rubus idaeus L.) orgánica. Se establecieron cuatro tratamientos: T1) aplicación de Trichoderma sp. cepa Clombta (1x107 conidios/mL); T2) aplicación de Trichoderma sp. cepa Clorolota (1x107 conidios/mL); T3) Co-aplicación (aplicación de las dos cepas de Trichoderma: Clombta y Chlorolota a 1x107 conidios/mL) y T4) Control [Bacillus subtilis (3.75 mL/L), extracto de Larrea tridentata (2.5 mL/L) y resina de pino (0.5 mL/L)]. Las variables epidemiológicas evaluadas fueron severidad, índice de severidad y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). La severidad fue significativamente menor ($P<0.05$) en el Control (21 días=38.39% y 28 días=34.33%) y en la Co-aplicación de Trichoderma spp. (21 días=38.61% y 28 días=35.72%), en comparación con el resto de los tratamientos (entre 39.78-46.28%). Asimismo, tanto el Control (59.8 y 71.6%) y la Co-aplicación (61.1 y 73.5%) redujeron al mismo nivel el índice de severidad y el ABCPE (Control=68.7 y Co-aplicación=71.2), en comparación con la aplicación individual de las cepas de Trichoderma spp. El uso de la mezcla de las dos cepas nativas de Trichoderma es igual de eficiente que el Control para el manejo integrado de la roya en frambuesa orgánica.

Palabras clave: Biocontrol; frutillas; incidencia; severidad.

REFERENCIAS

[1] S. G. Rebollar-Alviter, G. Leyva-Mir, G. Mora-Aguilera, G. Valdovinos-Ponce, S. Romero-Ceva, "Identificación y biología del agente causal de la roya de la frambuesa roja (Rubus idaeus L.) en México," Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 19, no. 2, pp. 168-174, 2001.

[2] C. Morales, M. González, J. Hirzel, G. Herrera, M. Madariaga, L. Devotto, M. Gerding, J. Riquelme, A. France, H. Uribe, A. Pedreros, J. San Martín, "Aspectos relevantes en la producción de frambuesa (Rubus idaeus L)," Boletín Instituto de Investigaciones Agropecuarias, vol. 192, pp. 1-116, 2009.

RESPUESTA A DOS FUENTES DE FERTILIZACIÓN EN NOPAL (*Opuntia ficus-indica*, VAR. ATLIXCO) EN SALVATIERRA, GUANAJUATO. (REACTION OF NOPAL (*Opuntia ficus-indica*, VAR. ATLIXCO) TO TWO SOURCES OF FERTILIZATION AT SALVATIERRA, GUANAJUATO).

[1*]Moreno-Zacarías, P.E., [2]Ruiz-Ruiz, G., y [2]Arroyo-Figueroa, G.

1. Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra, Coordinador de Carrera en Ing. En Innovación Agrícola Sustentable. Calle Manuel Gómez Morín 300, Comunidad de Janicho, Salvatierra, Guanajuato, México 38933
2. Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra, Estudiante de la Carrera de Ing. En Innovación Agrícola Sustentable. Calle Manuel Gómez Morín 300, Comunidad de Janicho, Salvatierra, Guanajuato, México 38933

*Autor para correspondencia: pemoreno@itess.edu.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado con el objetivo de evaluar la influencia de dos fuentes de fertilización foliar en nopal (Opuntia ficus-indica, var. Atlixco), en la comunidad de Urireo, Municipio de Salvatierra, en el estado de Guanajuato. Dos fuentes de fertilización, Adifost+Ekoterrane, un biofertilizante elaborado en el ITESS, y un testigo aplicando agua solamente con cuatro repeticiones, fueron establecidas en un cultivo de dos años de edad, el control de malezas se realizó de forma manual, para el control de insectos se colocaron trampas cromáticas. Se registró la dimensión de los cladodios desde el ápice a la base en donde se determinó que los tratamientos con (Adifost + Ekoterrane) y sorpresivamente sin la adición de fertilizante generaron la variación por el cultivo. En la región mas ancha de la "raqueta" a diferencia del resultado anterior, la causa de la variación se registró con el uso de Adifost + Ekoterrane y el Biofertilizante ITESS. En relación a las variables de peso fresco y peso seco, pH, densidad del mucílago, grados Brix en el cladodio, igualmente no se encontraron diferencias como respuesta a las dos fuentes de fertilización.

Palabras clave: Fertilización foliar, nopal, biofertilizante itess.

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of evaluating the influence of two sources of foliar fertilization in nopal (*Opuntia ficus-indica*, var. Atlixco), in the community of Urireo, municipality of Salvatierra, in the state of Guanajuato. Two sources of fertilization, Adifost + Ekoterrane, a biofertilizer made in the ITESS, and a control water using only four replicates, were established in a two-year-old crop cultivar; weed control has been made by hand and control insects were placed chromatic traps. The size of the cladodes was recorded from the apex to the base and the treatments with (Adifost + Ekoterrane) and surprisingly without the addition of fertilizer were the largest. In the wider region of the "racket" unlike the previous result, the widest were registered with the use of Adifost + Ekoterrane and Biofertilizer ITESS. In spite of fresh weight and dry weight, pH, density of mucilage, degrees Brix in the cladodium, no differences were also found in response to the two sources of fertilization.

Keywords: biofertilizer itess, Adifost + Ekoterrane, foliar fertilization, nopal.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de nutrimentos a las plantas a suelo o de manera foliar, tienen como objetivos el favorecer su crecimiento, aumentar su producción en tejidos vegetativos o generativos, mejorando con esto su calidad comercial y nutritiva.[1] El presente trabajo fue realizado con el objetivo de evaluar la influencia de dos fuentes de fertilización del nopal (*Opuntia ficus-indica*, var. Atlixco).

La fertilización, el estado nutrimental, la condición fisiológica y la edad del cladodio son características correlacionadas en el desarrollo de la planta. Los abonos o materiales que se aplican directamente o indirectamente a las plantas, para favorecer su crecimiento, aumentar su producción o mejorar su calidad, en suma, ayudan a favorecer la multiplicación de la masa vegetal y regular el crecimiento de determinadas partes de la planta (órganos vegetativos o generativos), mejorando con esto la calidad comercial y nutritiva de la misma [1].

En la producción de nopal se han observado buenos resultados combinando estiércoles con fertilizantes químicos [2][3], aunque no hay consenso en cuanto a la dosis de fertilización; Méndez (2003) recomienda aplicar entre 100 y 120 kg de nitrógeno (N), 80 a 100 kg de fósforo (P) y 100 a 120 kg de potasio (K) y Mondragón *et al.,*[4] proponen complementar la fertilización química con un mínimo de 20 t ha-1 de estiércol vacuno cada dos años.

La fertilización foliar se ha convertido en una práctica común e importante para los productores, porque corrige las deficiencias nutrimentales de las plantas, favorece el buen desarrollo de los cultivos y mejora el rendimiento y la calidad del producto. La fertilización foliar no substituye a la fertilización tradicional de los cultivos, pero sí es una práctica que sirve de respaldo, garantía o apoyo para suplementar o completar los requerimientos nutrimentales de un cultivo que no se pueden abastecer mediante la fertilización común al suelo. [5]

Dentro de estos complementos orgánicos, se tienen los abonos foliares o biofermentos por lo general se emplean de forma diluida [6]. Sánchez-Urdaneta y Peña [7] evaluaron diferentes mezclas de fertilizantes en diferentes cultivares de nopal encontrando diferencias entre mezclas y cultivares, en este sentido, se busca evaluar la eficiencia de un bioferilizante foliar formulado en el ITESS contra dos productos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue llevada en los campos de la empresa "PLANPULU S.C. de R.L.", ubicado en Urireo, Municipio de Salvatierra, en el estado de Guanajuato, en las coordenadas geográficas latitud 20.215556 y longitud 100.840556 a una mediana altura de 1800 metros sobre el nivel del mar. El material empleado fue nopal (*Opuntia ficus indica* var. *Atlixco*) de dos años de edad, establecidas en hileras de este a oeste en el mes de febrero del 2016. La distancia de plantación fue 40 cm entre planta y planta y 30 cm de ancho, empleando camas de 1.60 m, con una altura de 40 cm de altura (Ilustración 1). Se asignó un área de 900 m^2, con una población total de 2400 cladodios, La aplicación de los fertilizantes inició a la siembra, con un intervalo de 15 días por un período de cuatro meses, a partir de la aplicación inicial, para un total de ocho aplicaciones durante el ciclo.



Ilustración 1. Establecimiento del cultivo de nopal.

El control de malezas se realizó de forma manual, de acuerdo al estado de la parcela [8]. Para el control de insectos [9], se colocaron trampas cromáticas así como la colocación de recipientes con una dilución de melaza, agua y jabón.

Tabla 1. Tratamientos y dosis de fertilización.

Tratamiento	Dosis de fertilización	Fuente de fertilización
T_1	N/A	Sin fertilizante
T_2	600 ml / 12 L	Adifost
	200 ml/ 12 L	Ekoterrane
T_3	600 ml/ 12 L	Biofertilizante ITESS

Tabla 2. Diseño establecido en campo.

Bloque I	Bloque II	Bloque III	Bloque IV
t_3	t_2	t_3	t_1
t_1	t_3	t_1	t_2
t_2	t_1	t_2	t_3

1 L, melaza en 1 L agua y 5 g de jabón en polvo neutro), a lo largo de la parcela. En el caso de enfermedades, en nuestra zona experimental no se presentaron brotes por ningún patógeno, cabe mencionar que en la parcela vecina, también se dieron las podas de sanidad como evento preventivo.

El sistema de riego en toda la parcela fue por goteo, aplicado de acuerdo a las necesidades del cultivo, ya que se tuvieron lluvias atípicas. Se emplearon tres tratamientos de fertilización de forma foliar: el asignado como testigo absoluto (t_1) en el cual, no se aplicó ninguna dosis de fertilización, tratamiento dos (t_2) se emplearon dos productos, que de forma habitual, el agricultor empleaba de manera usual, de acuerdo a las recomendaciones del técnico proveedor del producto y en el (t_3) se aplicó un biofertilizante elaborado en el Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra; y las dosis empleadas fueron: (tabla 2), se estableció un diseño de bloques al azar con cuatro bloques (tabla 3).

Tabla 3. Análisis nutrimental.

NUTRIMENTOS	Testigo * (ppm)	EKOTERRANE (ppm)	ADI-FOST (ppm)	Biofermento ITESS (ppm)
N- Total	----------	600,000	----------	4 580
N	----------	----------	294. 79	
N-Inorgánico	9.39	----------	----------	1 200
P-Total	----------	58.70	----------	----------
P	28.45	----------	8 500	----------
K-Total	----------	3 900	15 200	----------
K	370.94	----------	----------	5 510
Ca	5 272.22	2 800	4 200	1 860
Mg	1 134.86	1 200	1 500	630
Na	231.16	1 600	18 400	----------
Na. Soluble	----------	----------	----------	27.775
Cu (ppm)	1.59	5.39	27.86	3.351
Mn (ppm)	26.50	0.46	1.94	11.224
Fe (ppm)	19.48	130.20	3.45	153.021
Zn (ppm)	0.43	29.14	40.61	5.055

* Concentración en suelo

Como parte de las pruebas analíticas, se realizó el análisis de suelo en el laboratorio de Análisis de suelos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo experimental Bajío, antes de la aplicación y del Biofermento elaborado en el Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra. Asimismo, se describe la formulación de fábrica para los fertilizantes empleados (ADI-FOST y EKOTERRANE) (tabla 4).

Se registraron las dimensiones de los cladodios, longitud de base a ápice y ancho determinado de manera transversal, se recolectaron 1560 muestras, 520 unidades por cada tratamiento. La concentración de acidez (pH) se determinó utilizando un potenciómetro de mesa HANNA instrumentos HI211 pH/ORP meter. Para obtener la densidad, el extracto de mucílago se mezcló con agua desionizada

en relación 1:3, dejando reposar de 24-48 horas para posteriormente ser filtradas para determinar su densidad se tomó un mililitro para obtener su masa en gr, usando la fórmula: $\rho = \frac{m}{v}$. Cada submuestra se evalúo por triplicado, para un total de 108 determinaciones. Finalmente se midieron los grados Brix utilizando un refractómetro HANNA HI 96801 de 0 a 85% grados Brix.

Los registros fueron capturados en el programa estadístico Minitab, y se corrió un análisis de varianza para cada variable con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta del cultivo

De acuerdo a nuestros registros y análisis estadísticos, se registraron diferencias en el desarrollo de los cladodios.

En primer término, se observó una diferencia significativa para la variable "largo" (tabla 5), y bajo la prueba de Tukey, se determinó que los tratamientos con (Adifost + Ekoterrane) y sorpresivamente sin la adición de fertilizante generaron la variación por el cultivo (tabla 6).

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada.	MC Ajustada.	F	P
TRATAMIENTO	2	3117.05	3117.05	1558.52	482.14	0.000
BLOQUE	3	3.21	3.21	1.07	0.33	0.803
Error	1554	5023.27	5023.27	3.23		
Total	1559	8143.53				

Tabla 4. Análisis de varianza para la variable LARGO (cm), utilizando SC ajustada para pruebas.
GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Media de Cuadrados.

Tabla 5. Comparación de valores promedio para la variable LARGO bajo de tres niveles de fertilización orgánica en condiciones de campo usando el Método Tukey.

TRAT	N	Mean	Agrupación
2	520	42.308	A
1	520	42.176	A
3	520	39.210	B

Promedios no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

En segundo término se observó una diferencia significativa para la variable "ancho (Tabla 7), pero a diferencia del resultado anterior, la causa de la variación se registró con el uso de Adifost + Ekoterrane y el Biofertilizante ITESS (Tabla 8).

Se sugiere que las diferencias en la magnitud del desarrollo de los cladodios, fueron generados por la fertilización foliar aplicada. Trinidad y Aguilar [5] describen que esta práctica aportará los requerimientos nutrimentales o corregir deficiencias de aquellos nutrimentos que no fueron aplicados en un fertilización al suelo

Tabla 6. Análisis de varianza para ANCHO (cm), utilizando SC ajustada para pruebas.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada.	MC Ajustada.	F	P
TRATAMIENTO	2	1377.65	1377.65	688.82	87.87	0.000
BLOQUE	3	24.75	24.75	8.25	1.05	0.368
Error	1554	12182.50	12182.50	7.84		
Total	1559	13584.91				

GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Media de Cuadrados.

Tabla 7. Comparación de valores promedio para la variable ANCHO bajo de tres niveles de fertilización orgánica en condiciones de campo usando el Método Tukey.

TRAT	N	Mean	Agrupación
2	520	21.454	A
3	520	21.261	A
1	520	19.370	B

En relación a las variables de peso fresco (tabla 9) y peso seco (tabla10), igualmente no se encontraron diferencias en respuesta a los tres niveles de fertilización.

Tabla 8. Análisis de varianza para peso fresco (gr).

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada.	MC Ajustada.	F	P
TRATAMIENTO	2	7.407	7.407	3.704	0.55	0.585
BLOQUE	2	1.852	1.852	0.926	0.14	0.872
Error	22	148.148	148.148	6.734		
Total	26	157.407				

Tabla 9. Análisis de varianza para peso seco (gr).

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada.	MC Ajustada.	F	P
TRATAMIENTO	2	0.6798	0.6798	0.3399	0.66	0.526
BLOQUE	2	3.1385	3.1385	1.5693	3.06	0.067
Error	22	11.2962	11.2962	0.5135		
Total	26	15.1145				

Los efectos de la fertilización foliar en nopal son poco conocidos, Sánchez-Urdaneta y Peña-Valdivia [7] describen que la movilización de tres formas diferentes de fuente de nitrógeno aplicadas foliarmente a través del cladodio en tres variedades, no registraron diferencias para la penetración de los compuestos

empleados a las 12 horas posteriores a su aplicación, esto puede explicarse por el grosor de la cutícula, el grosor del colénquima y otros factores afecten la movilización de los productos por lo tanto, se sugiere que la aplicación del Biofermento elaborado en el Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra y la mezcla de los fertilizantes empleados (Adifost + Ekoterrane) pudieron tener una tasa de inserción y asimilación similar en los cladodios.

Tabla 10. Valores promedio en la concentración de acidez (pH).

Tratamiento	pH
t_1	4.83
t_2	4.81
t_3	4.82

t_1: testigo, t_2: productos de la empresa y t_3: biofertilizante ITESS.

La respuesta promedio cultivo al cuantificar el pH en el mucílago se muestra en la Tabla 11.
Los registros sometidos al análisis de varianza arrojó que no existen diferencias para esta variable (Tabla 12).

Estos resultados concuerdan con el trabajo de Alvarado-Raya [10] y colaboradores en donde al aplicar lixiviado de composta orgánico de manera foliar o al suelo, los cladodios de las plantas tratadas no mostraron diferencias significativas en el pH, siendo un promedio de 4.7; muy similar a lo encontrado en nuestros análisis.

Tabla 11. Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada.	MC Ajustada.	F	P
TRATAMIENTO	2	0.00362	0.00362	0.00181	0.13	0.878
BLOQUE	3	0.48599	0.48599	0.16200	11.64	0.000
Error	30	0.41749	0.41749	0.01392		
Total	35	0.90710				

GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Media de Cuadrados.

La densidad en el mucílago del nopal, a través del análisis de varianza arrojó una respuesta promedio en donde no se observa ningún efecto generado por la fertilización (tabla 11) y por ende, en los valores para cada tratamiento (tabla 13). En coincidencia con los resultados de Maki-Díaz [11], también no se encontraron diferencias entre los cultivares para la concentración del mucílago en la planta. Así también, Las diferencias pueden atribuirse a la época y ambiente de cultivo, pues este grupo de polisacáridos amortigua las fluctuaciones del ambiente y su concentración se modifica por factores como la caída del potencial de agua del suelo [12].

Determinación de la característica química grados Brix
La respuesta promedio obtenida por la adición de fertilizantes registrada por la característica grados Brix muestra que el efecto del tratamiento t1 arroja una concentración un poco mayor de sacarosa presentes en el nopal, seguido por el tratamiento t3, mientras que el tratamiento t2 muestra la menor

concentración del azúcar. (Tabla 13). La respuesta promedio cultivo al cuantificar el pH en el mucílago se muestra en la Tabla 11.

Tabla 12. Análisis de varianza para densidad (g/ml), utilizando SC ajustada para pruebas.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada.	MC Ajustada.	F	P
TRATAMIENTO	2	0.011974	0.011974	0.005987	0.85	0.436
BLOQUE	3	0.079487	0.079487	0.026496	3.78	0.021
Error	30	0.210472	0.210472	0.007016		
Total	35	0.301933				

GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Media de Cuadrados.

Tabla 13. Valores promedio (n=12) en la evaluación de tres niveles de fertilización orgánica en nopal para la variable densidad.

Tratamiento	Densidad (gr/ml)
t_1	1.0116
t_2	0.9804
t_3	0.9682

t_1: testigo, t_2: productos de la empresa y t_3: biofertilizante ITESS

Tabla 14. Valores promedio (n=12) en la evaluación de tres niveles de fertilización orgánica en nopal para la variable grados Brix.

Tratamiento	Grados Brix
t_1	0.5167
t_2	0.5083
t_3	0.5583

t_1: testigo, t_2: productos de la empresa y t_3: biofertilizante ITESS

Tabla 15. Análisis de varianza para grados Brix, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada.	MC Ajustada.	F	P
TRATAMIENTO	2	0.017222	0.017222	0.008611	2.27	0.121
BLOQUE	3	0.361111	0.361111	0.120370	31.71	0.000
Error	30	0.113889	0.113889	0.003796		
Total	35	0.113889				

GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Media de Cuadrados.

La falta de variación, se corrobora con la prueba de Tukey, en donde muestra que todos los tratamientos, generaron un comportamiento similar para la variable al encontrarse agrupados. Sin

embargo, se puede sugerir que bajo la aplicación del Biofertilizante ITESS, tratamiento (t3) se obtuvo una mayor concentración en la variable de respuesta grados Brix en relación con el efecto de los fertilizantes aplicados (Tabla 16).

Tabla 16. Método Tukey, comparación de valores promedio para la variable grados Brix en condiciones de laboratorio.

Tratamiento	N	Media	Agrupación*
3	12	0.5583	A
1	12	0.5167	A
2	12	0.5083	A

* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Posterior al análisis de la respuesta del cultivo registrado en los parámetros expuestos en el presente documento, nos arroja que la concentración de micronutrimentos no tiene mayor efecto en el desarrollo de los cladodios.

Con base en nuestros resultados se sugiere realizar estudios sobre los efectos de la fertilización en suelo complementada con la fertilización foliar así como la tasa de migración de diferentes fuentes nutrimentales bajo las condiciones de campo en nuestra zona de estudio.

CONCLUSIONES

- La aplicación de la fertilización foliar, generó un mayor desarrollo en las dimensiones de los cladodios.
- La aplicación de Biofermento elaborado en el Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra y los fertilizantes empleados (ADI-FOST y EKOTERRANE), no generaron diferencias en peso fresco, peso seco, pH, concentración del mucílago, y grados Brix de los cladodios.

REFERENCIAS

[1] A. Finck, *Fertilizantes y fertilización: fundamentos y métodos para la fertilización de los cultivos*. España, 1988.

[2] F. Robles Contreras, R. Macías Duarte, and R. L. Grijalva Contreras, "Tecnología de producción de nopal verdura para el noroeste de sonora," *Inifap*. 2008.

[3] F. H. Ruiz-espinoza *et al.*, "Rendimiento y Crecimiento de Nopalitos de Cultivares de Nopal Yield and Growth of Green Cladodes of Prickly Pear (Opuntia ficus-indica) Cultivars under Different Plant Densities," *Jpacd.Org*, no. September 2007, pp. 22–35, 2008.

[4] Mondragón-Jacobo C. and P.-G. S., Eds., "Mondragón J., C.; S. J. Méndez G. G. Olmos O.," in *El nopal (Opuntia spp.) como forraje*, Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agrícultura y la Alimentación, 2003, p. 169.

[5] A. Trinidad Santos and D. Aguilar Manjarrez, "Fertilización foliar, un respaldo importante en el rendimiento de los cultivos," *Terra Latinoam.*, vol. 17, no. 3, pp. 247–255, 1999.

[6] J. Picado, A. Alfredo, and S. Agricultura, "Preparación y uso de abonos orgánicos, sólidos y líquidos," vol. I, p. 66, 2005.

[7] A. B. Sánchez-Urdaneta and C. B. Peña-Valdivia, "Movilización de AG 3 , TDZ y urea asperjados en cladodios de nopal (Opuntia ficus-indica (L .) Miller)," *Rev. la Fac. Agron. Univ. del Zulia*, vol. 28, no. 1, pp. 150–160, 2011.

[8] I. del R. y Dueñas, *Grana cochinilla fina regalo de México para el mundo*, 1a ed. Oaxaca, México: Gobierno del estado de Oaxaca, 2006.

[9] J. H. Siller-Cepeda, M. A. B. Sañudo, A. S. Barajas, and R. B. Sañudo, *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Guía para el agricultor. Buenas prácticas agrícolas para frutas y hortalizas frescas.*, 1a ed. México D. F.: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación., 2002.

[10] E. S.-C. y G. O.-H. Alvarado-Raya, H. E., "Peso fresco y calidad de nopalito (Opuntia ficus-indica L .) fertilizado con composta de estiércol de vaca," *TECNOCIENCIA Chihuahua*, vol. 10, no. 1, pp. 13–22, 2016.

[11] G. Maki-Díaz, C. B. Peña-Valdivia, R. García-Nava, M. L. Arévalo-Galarza, G. Calderón-Zavala, and S. Anaya-Rosales, "Características físicas y químicas de nopal verdura (Opuntia ficus-indica) para exportación y consumo nacional," *Agrociencia*, vol. 49, no. 1, pp. 31–51, 2015.

[12] E. Acevedo, I. Badilla, and P. S. Nobel, "Water Relations, Diurnal Acidity Changes, and Productivity of a Cultivated Cactus, Opuntia ficus-indica," *Plant Physiol.*, vol. 72, no. 3, pp. 775–80, 1983.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) CON APLICACIÓN DE ESTIÉRCOL DE ANIMALES DE GRANJA EN TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO.

*Vázquez-Lares, E. y Piceno-Hernández, R.

Universidad Autónoma de Guadalajara, Departamento de Agronomía y Zootecnia. Avenida Patria # 1201 colonia Lomas de Valle, Zapopan, Jalisco cp. 45129.

*Autor para correspondencia: emmanuelvl_710@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), considerado una alternativa como fuente de proteína de origen vegetal, es cultivado particularmente en temporal, por lo que es importante la búsqueda de mejores prácticas de manejo que conduzcan a un uso más eficiente de recursos, como agua y nutrimentos esenciales para un mayor rendimiento (Díaz et, al 2004). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento del amaranto aplicando deyecciones de animales de granja (aves y bovinos). El desarrollo del proyecto fue durante los meses de Mayo a Julio del año 2017 en el municipio de Tlajomulco de Zuñiga Jalisco, para lo cual se estableció una parcela experimental dividida en tres repeticiones, aplicando un diseño experimental completamente al azar quedando de la siguiente manera tratamiento 1 (T1) al cual se le aplicó gallinaza, tratamiento 2 (T2) denominado como testigo tratado únicamente con agua y tratamiento 3 (T3) con aplicación de estiércol de bovino, la toma de datos comenzó a partir de la segunda semana posterior a la emergencia de la planta realizando un muestreo aleatorio, los valores obtenidos fueron: longitud de la planta, longitud de raíz y número de hojas. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias al 95% con el paquete estadístico SAS. La evaluación mostró diferencia significativa ($P< 0.05$) así como la formación de dos grupos en la prueba de comparación de medias. Con los resultados obtenidos se puede concluir que la gallinaza mostró los mejores resultados en cuanto al crecimiento y desarrollo de la planta de amaranto.

Palabras clave: Amaranto, estiércol, animales, crecimiento.

REFERENCIAS

[1] Díaz, O, A. Escalante, E, A. Trinidad, S, A. Sanchez, G, A. Mapes, S, C. Martínez, M, D.. (2004). RENDIMIENTO, EFICIENCIA AGRONÓMICA DEL NITRÓGENO Y EFICIENCIA EN EL USO DEL AGUA EN AMARANTO EN FUNCIÓN DEL MANEJO DEL CULTIVO . TERRA Latinoamericana, 22, 109 - 116.

[2] Perez, T, C, B. Aragon, G, A. Perez, A, R. López, O, J, F.. (2011). ESTUDIO ENTOMOFAUNÍSTICO DEL CULTIVO DE AMARANTO (Amaranthus hypochondriacus L.) EN PUEBLA, MÉXICO. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas , 2, 359 - 371.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN ABEJAS (*Apis mellifera*) DE LA REGIÓN CENTRO DE JALISCO.

[1]Labrador-Castorena, M.F., [1*]Velázquez-Juárez, G., [2]Rojas-López, C.A., [2]Padilla-Salas, V.R.

1. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Departamento de Química, Blvd. Marcelino García Barragán, Guadalajara Jalisco, México 44430.
2. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Producción Animal. Centro de Estudios Apícolas, Camino a Ramón Padilla Sánchez, Nextipac, Zapopan Jalisco; México 44600.

*Autor para correspondencia: gilvelazquez83@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La influencia de los microorganismos presentes en la microbiota de las abejas *Apis mellifera* con respecto a las propiedades antioxidantes que se confieren a sus productos tales como propóleo, jalea real y polen, es en gran parte inexplorada. Las abejas así como otros insectos en su gran mayoría cuentan con bacterias benignas en su tracto intestinal, ya sean bacterias heredadas o adquiridas del medio ambiente que son importantes para su nutrición y defensa de patógenos. Existen pocos estudios sobre la caracterización bioquímica y molecular de la microbiota de *A. mellifera* correspondiente a la región centro de Jalisco. Es importante caracterizar las propiedades antioxidantes que esta microbiota aporta a los productos que típicamente son obtenidos de las abejas. El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar los aislados bacterianos del tracto intestinal de las abejas *A. mellifera* de la región centro de Jalisco mediante técnicas de bioquímica y biología molecular para poder entender la influencia de estos microorganismos en los mecanismos de producción de moléculas antioxidantes. Para ello se tomaron muestras del tracto intestinal de abejas obreras *A. mellifera* proporcionadas por el Departamento de Producción Animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Posteriormente se realizó el cultivo de la microbiota extraída de los intestinos de las abejas (*A. mellifera*) para explorar las comunidades bacterianas de las muestras. El cultivo se realizó en diversos medios tales como Agar Luria-Bertani (LB), Agar dextrosa papa (PDA) y Agar dextrosa Sabouraud. Los aislados fueron caracterizados mediante técnicas de medición de actividad antioxidante utilizando los métodos de barrido de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Los resultados muestran que algunos aislados bacterianos presentan actividad antioxidante, asimismo se ha comenzado con la caracterización molecular mediante extracción del DNA genómico de estos aislados mediante DNAzol® para poder realizar la PCR punto final, correspondiente a la amplificación de una región de 1kb del 16S, mismas que serán empleadas para secuenciar y determinar el género al cual pertenecen dichos aislado.

Palabras clave: *Apis mellifera*; microbiota; actividad antioxidante; PCR.

INTRODUCCIÓN

Las abejas *Apis mellifera* son responsables de la elaboración de productos que son ampliamente utilizados en la medicina tradicional por presentar diversas bioactividades, entre los más estudiados se encuentran el propóleo, la jalea real y el polen. [1] El propóleo es una sustancia pegajosa que las abejas melíferas fabrican mezclando sus propias ceras con la savia resinosa obtenida de la corteza y las hojas de ciertos árboles y otras plantas con flores, se usa como sellante y esterilizante en los nidos de abejas. Se reconoce que el propóleo tiene una amplia gama de actividades biológicas entre las que se encuentra la actividad antioxidante. [2] La jalea real es una sustancia viscosa secretada por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras como alimento esencial para la larva de la reina y para la propia reina. La jalea real se compone de proteínas, aminoácidos libres, lípidos, vitaminas y minerales, junto con un gran número de sustancias bioactivas. La jalea real tiene varias actividades farmacológicas y es utilizada en la elaboración de cosméticos en muchos países por sus ligeros efectos antioxidantes, aunque estos son más débiles que los de la vitamina E. [3] El polen de abeja es un valioso producto terapéutico muy apreciado por la medicina natural debido a sus aplicaciones médicas y nutricionales potenciales. Demuestra una serie de acciones como antifúngicos, antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, hepatoprotectores, inmunoestimulantes anticancerosos y analgésicos locales. Su potencial de barrido radical también ha sido reportado.[4] En el presente trabajo de investigación se tiene un especial interés por la actividad antioxidante que presentan estos productos y se pretende demostrar que esta bioactividad es en parte proveniente de la carga bacteriana benigna presente en el tracto intestinal de las abejas *A. mellifera* de la región centro de Jalisco, caracterizando aislados bacterianos de dicha especie mediante técnicas de bioquímica y biología molecular.

La importancia de las comunidades microbianas que habitan en el intestino de los animales, desde los humanos hasta los insectos, en la salud ha sido ampliamente apreciada apenas recientemente.[5] Todos los animales viven en simbiosis. Las asociaciones huésped-bacteriana se han convertido en relaciones prósperas creando mecanismos para beneficios mutuos tanto para microorganismos como para huéspedes. Lo más impresionante de esta relación puede ser el concepto de que el huésped no sólo tolera, sino que ha evolucionado para requerir la colonización por microorganismos beneficiosos, conocidos como comensales, para diversos aspectos del desarrollo y la función inmune. La microbiota proporciona señales críticas que promueven la maduración de las células y tejidos inmunes, lo que conduce a la protección contra infecciones por agentes patógenos. Las bacterias intestinales también parecen contribuir a trastornos inmunes no infecciosos como la enfermedad inflamatoria intestinal y la autoinmunidad. El modo en que la microbiota influye en las respuestas inmunitarias del huésped es un área activa de investigación con importantes implicaciones para la salud humana. Desbloquear cómo las bacterias beneficiosas afectan el desarrollo del sistema inmunológico puede conducir a terapias nuevas y naturales basadas en el aprovechamiento de las propiedades inmunomoduladoras de la microbiota.[6]

Para poder evaluar la influencia de los microorganismos aislados del tracto intestinal de *A. mellifera* en los mecanismos de producción de moléculas antioxidantes se trabajó con dos radicales libres que se utilizan comúnmente para evaluar la actividad antioxidante; el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

El ensayo ABTS mide la capacidad relativa del antioxidante para eliminar el radical ABTS generado en fase acuosa, en comparación con un estándar de Trolox (que es un análogo de vitamina E soluble en agua). El radical ABTS se genera haciendo reaccionar un agente oxidante fuerte (permanganato de

potasio o persulfato de potasio) con la sal de ABTS. La reducción de la solución de color azul-verde del radical ABTS por el antioxidante donador de hidrogeno, se mide mediante la supresión de su espectro de absorción característico a una longitud de onda de 734 nm.[7] DPPH es un radical libre estable con una banda de absorción a 515 nm. Pierde esta absorción cuando es reducida por un antioxidante o una especie de radicales libres. El método DPPH se usa ampliamente para determinar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos purificados, así como extractos de plantas naturales.[8] Se encontró que la mayoría de los antioxidantes fenólicos reacciona lentamente con DPPH, alcanzando un estado estacionario en 1-6 h o más.[9] Esto sugiere que la actividad antioxidante usando DPPH debe ser evaluada con el tiempo. El método también tiene buena repetibilidad y se usa con frecuencia. Sin embargo, al igual que ABTS, tiene una importancia limitada, si es que existe, para los sistemas biológicos. Además, la interferencia del color de DPPH con muestras que contienen antocianinas conduce a la subestimación de la actividad antioxidante.[10]

A altas concentraciones, los radicales libres y las especies reactivas no radicales son peligrosas para los organismos vivos y dañan todos los constituyentes celulares principales. Sin embargo, a concentraciones moderadas, el óxido nítrico (NO), el anión superóxido y las especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionadas juegan un papel importante como mediadores reguladores en los procesos de señalización. Muchas de las respuestas mediadas por ROS protegen realmente a las células contra el estrés oxidativo. Sin embargo, organismos superiores han desarrollado el uso de NO y ROS como moléculas de señalización para otras funciones fisiológicas. Se ha implicado un aumento excesivo y/o sostenido de la producción de ROS en la patogénesis del cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide, lesión por isquemia, apnea obstructiva del sueño y otras enfermedades. Además existe una creciente evidencia de que el envejecimiento implica cambios progresivos en los procesos reguladores mediados por radicales libres que resultan en alteración de la expresión génica. [11]

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento bacteriano

Las muestras de abejas fueron recolectadas de 6 colmenas distintas para su análisis independiente en el apiario No. 1, en el mes de Julio de 2017 en el área de apicultura del departamento de producción animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara localizado en el Km 15.5 de la carretera Guadalajara-Nogales, en el predio las agujas, Nextipac municipio de Zapopan, Jalisco, México, de acuerdo a las coordenadas: 20°44'50.3" de latitud norte y 103°30'43.6" de longitud oeste y una altitud de 1662 msn.

Las abejas se recolectaron en el sitio utilizando tubos Falcon® de 50 mL (Fig. 1), y se almacenaron en un baño de hielo para su transporte. Posteriormente las abejas se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas en etanol al 75%. Se realizó la extracción de los intestinos de un total de 19 abejas de la colmena No. 106 y se colocarón en 10 mL de solución salina fisiológica. De esta solución se realizarón 3 diluciones y se realizó la siembra por inclusión en 3 medios de crecimiento: Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), Agar Dextrosa Papa (PDA) y en Agar Luria-Bertani (LB). Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas.



Figura 1.
Muestreo de la colmena No. 106 en el área de apicultura del departamento de producción animal en el CUCBA por medio de tubos Falcon® de 50 mL.

Ensayo DPPH
Para el ensayo de DPPH se seleccionaron un total de 12 colonias aisladas entre los tres medios, con base a su morfología. Para la preparación de 25 mL de DPPH se pesaron 1.5 mg de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (Sigma-Aldrich®), se aforaron con metanol al 80% y se almaceno en un frasco ambar en refrigeración. Dentro de un area esteril se colocaron las muestras de las colonias seleccionadas en trozos de papel filtro 42 (Whatman®) independientes con ayuda de un asa de nicromo previamente esterilizada. Posteriormente se atomizaron las muestras con la solución de DPPH previamente elaborado y se dejaron en reacción durante 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se evaluo la presencia de un cambio de coloración en la solución DPPH de morado a un amarillo tenue indicando resultados positivo para actividad antioxidante (Fig. 2).

Ensayo ABTS
Para el ensayo de ABTS se seleccionaron un total de 9 colonias de acuerdo a los resultados cualitativos obtenidos en la prueba de DPPH. Para la realización del barrido de radical ABTS las colonias seleccionadas se inocularón en 10 mL de medio mínimo y se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. Una vez observado el crecimiento de las colonias en el medio mínimo, se prepararon 25 mL de ABTS pesando 96 mg de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico (Sigma-Aldrich®) y 12.8 mg de persulfato de amonio (Sigma-Aldrich®) y se aforaron con agua destilada. Se dejó reposar por 16 horas a temperatura ambiente. Una vez formado el radical ABTS se diluyo con agua destilada hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 750 nm.

A su vez se prepararon 10 mL de Trolox 800 µM como antioxidante de referencia para elaborar una curva de calibración de 0 a 400 µM (Fig.3) pesando 2 mg de ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Sigma-Aldrich®) y aforando con etanol/agua (50/50 v/v).

Cinética

Para la elaboración de la cinética de la reacción del radical ABTS se tomaron 20 µL de las muestras inoculadas en medio mínimo, se colocaron en una microplaca de 96 pocillos y se añadieron 280 µL de la solución de ABTS, esto se realizó por triplicado para cada una de las 9 colonias seleccionadas. Posteriormente las muestras se llevaron a leer a tiempo 0 en el fotómetro de microplacas Thermo Scientic Multiskan® EX con un rango de longitud de onda de 400 a 750 nm, utilizando para este análisis el filtro de 750 nm. Se tomaron lecturas en lapsos de 5 minutos durante 30 minutos hasta alcanzar el estado estacionario de la reacción. Los resultados se graficaron y se evaluó la cinética de comportamiento de la muestra junto con el antioxidante de referencia (Trolox).

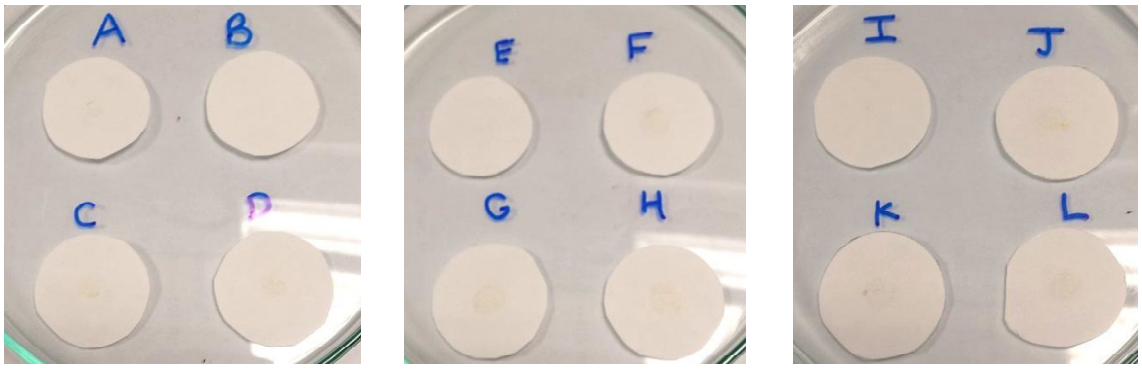
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se proporcionaran en el presente trabajo de investigación son de la extracción realizada de la primera de 6 colmenas muestreadas para su posterior análisis.

Ensayo DPPH

Los resultados obtenidos para el ensayo cualitativo para DPPH se muestran en la figura 2 donde podemos observar que un cambio de color muy evidente de morado a un amarillo paja, lo que nos indica que si presentan actividad antioxidante principalmente en las colonias A, C, D, F, G, H, J, K y L.

A



B

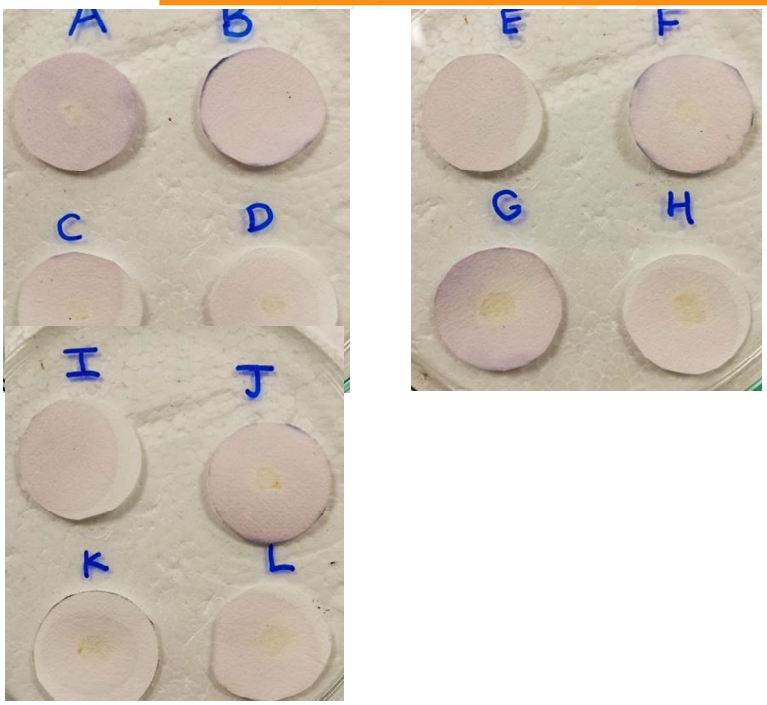


Figura 2.
A) *Muestras iniciales de las colonias seleccionadas para el ensayo DPPH.* ***B)*** *Resultados cualitativos obtenidos después de 30 minutos.*

Ensayo ABTS

Con base a los resultados obtenidos en el ensayo cualitativo de DPPH se optó por continuar con el ensayo cuantitativo de ABTS debido a que este ensayo es más fino y tiene un rango de sensibilidad mayor, para tener una mejor estimación de actividad antioxidante con las colonias A, C, D, F, G, H, J, K y L, los resultados obtenidos serán presentados calculando el porcentaje de inhibición para dichas colonias con la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{Abs_{ABTSi} - Abs_{muestra}}{Abs_{ABTSi}} \times 100$$

Dónde:

Abs_{ABTSi} = Es la absorbancia de la solución del radical libre del DPPH a tiempo cero.

$Abs_{muestra}$= Es la absorbancia debida al radical libre del DPPH remanente que queda luego de llevarse a cabo la reacción de reducción, cuando la reacción ha alcanzado el estado estacionario.

Una vez calculado el % de inhibición podemos apreciar que de las colonias seleccionadas cualitativamente no todas presentan una actividad antioxidante representativa de las cuáles se resaltan con mayor actividad antioxidante las colonias A,D,F,G y K (Tabla 1, Fig. 4).

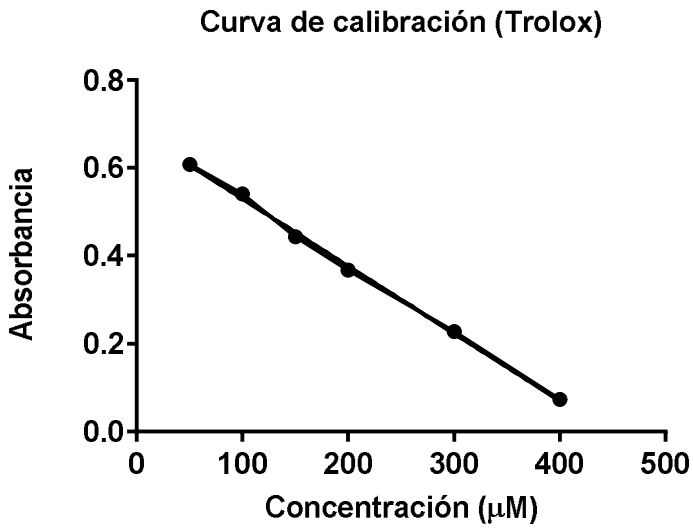


Figura 3. *Curva de calibración del antioxidante de referencia*

Tabla 1. *Resultados obtenidos del % de Inhibición a distintos tiempos del método ABTS*

	% Inhibición			
Colonia	**Tiempo 0**	**Tiempo 10**	**Tiempo 20**	**Tiempo 30**
A	39,38	42,29	44,10	49,10
C	29,86	33,29	34,90	38,00
D	32,52	35,81	37,67	41,24
F	34,10	38,48	40,14	44,52
G	39,62	41,95	44,10	44,50
H	34,76	37,62	34,90	39,19
J	34,19	36,29	37,67	38,57
K	36,38	38,43	40,14	39,90
L	28,62	31,57	33,00	34,57

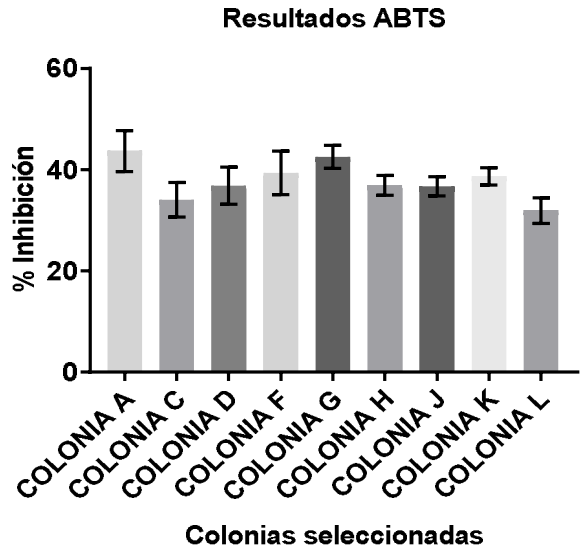


Figura 4. *Resultados obtenidos del % de inhibición de las colonias seleccionadas con el ensayo de barrido del radical ABTS.*

CONCLUSIONES

La actividad antioxidante de los aislados bacterianos presentes en la microbiota intestinal de *A. mellifera* de la región centro de Jalisco fue comprobada y cuantificada. Las colonias A,D,F,G y K mostraron mayor actividad antioxidante, como se muestra en la figura 4 donde se puede ver con más claridad el % de inhibición. Dando paso a la próxima etapa de la investigación donde se comenzó con la caracterización molecular de dichos aislados bacterianos.

REFERENCIAS

[1] T. Nagai, M. Sakai, R. Inoue, H. Inoue, and N. Suzuki, "Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis," *Food Chem.*, vol. 75, no. 2, pp. 237–240, 2001.

[2] V. D. Wagh, "Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials," *Adv. Pharmacol. Sci.*, vol. 2013, 2013.

[3] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J. A. Pérez-Álvarez, "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly," *J. Food Sci.*, vol. 73, no. 9, pp. 117–124, 2008.

[4] K. Komosinska-Vassev, P. Olczyk, J. Kaźmierczak, L. Mencner, and K. Olczyk, "Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2015, 2015.

[5] J. C. Clemente, L. K. Ursell, L. W. Parfrey, and R. Knight, "The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view," *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1258–1270, 2012.

[6] J. Chow, S. M. Lee, Y. Shen, A. Khosravi, and S. K. Mazmanian, "Host-bacterial symbiosis in health and disease," *Adv. Immunol.*, vol. 107, no. C, pp. 243–274, 2010.

[7] E. A. Shalaby and S. M. M. Shanab, "Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of Spirulina platensis," *Indian J. Mar. Sci.*, vol. 42, no. 5, pp. 556–564, 2013.

[8] A. Antioxidant, "P & A-017 Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic," *Measurement*, 2000.

[9] V. Bondet, W. Brand-Williams, and C. Berset, "Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 30, no. 6, pp. 609–615, 1997.

[10] M. B. Arnao, "Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 11, no. 11, pp. 419–421, 2001.

[11] W. Droge and W. Droge, "Free radicals in the physiological control of cell function," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 1, pp. 47–95, 2002.

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN GALLINAS PONEDORAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO MEDIANTE ENCAPSULADOS DE ALGINATO E INGESTA ORAL DIRECTA.

*Cerón-Zamora, C., Añorve-Morga, J., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A. y Gonzalez-Olivares, L.G.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Carr. Pachuca - Tulancingo Km. 4.5 Mineral de la Reforma Hidalgo, C.P. 42184

*Autor para correspondencia: carolain.28.03@gmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

La avicultura mexicana ha ido en incremento en los últimos años, generando 2,653 toneladas de huevo en el 2015. Esto ha ayudado a que el país ocupe un lugar importante a nivel mundial, siendo el 5º lugar en productor de huevo. Estas cifran han generado que México exporte el producto a países como Estados Unidos, Italia y Japón [1]. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la ingesta de aceite de pescado en el peso de las gallinas y del huevo producido, mediante suministración de los encapsulados de alginato e ingesta oral directa del aceite. El estudio se llevó a cabo con 49 gallinas de estirpes Plymouth Rock y Rhode Island Red de 18 semanas de edad que se colocaron en dos grupos: control (29 aves) y encapsulados de alginato (20 aves) en un corral de 4 x 4 metros dividido en dos partes. Cada división contenía 2 bebederos de plástico con capacidad de 3.5 litros. La división para el grupo control contaba con 2 comederos de tolva de 2.5 kilos de capacidad, y la otra división con un comedero con las mismas características, en donde se les depositaba el alimento comercial de la marca Purina® una vez al día. La suplementación con encapsulados de alginato se inició de manera individual, pero al observar que las aves se estresaban se optó por suministrar los encapsulados mezcladas con el alimento. Esto se realizó durante 30 días, posteriormente, la suministración del aceite de pescado se realizó por ingesta oral directa realizada con jeringas. Al finalizar los tratamientos, las aves y los huevos se pesaron de manera individual con una báscula digital. Los resultados obtenidos indican que el peso de las gallinas se vio afectado por el estrés provocado por variaciones en el clima, el manejo y la alimentación [2,3]. Sin embargo, se observó que la suplementación ejerció un efecto favorable en el peso del huevo pues los huevos producidos por el grupo suplementado presentaron un aumento de peso estadísticamente significativo comparado con los del grupo control. La ganancia de peso en el huevo es favorable para los productores avícolas, siendo la suplementación mediante encapsulados la forma más eficiente para suministrar el aceite de pescado ya que no genera estrés, asociado con el manejo, reduciendo la pérdida de peso en el ave.

Palabras clave: Suplementación; aceite de pescado; gallinas ponedoras; peso del huevo; estres.

REFERENCIAS

[1] SIAP, "Atlas agroalimentario 2016". México, D.F., 2016

[2] J. L. Corona, "Efecto del estrés calórico sobre la fisiología y calidad del huevo en gallinas ponedoras", España: Rev. Electrón. vet.,vol. 14, 2013

[3] M. M. Estrada, et al. "Efecto de la temperatura y la humedad relativa en los parámetros productivos y la trasferencia de calor en pollos de engorde", Rev. Col. Cienc. Pec., vol.20, pp.288-303, 2007.

OBTENCIÓN DE HUEVOS DE GALLINAS PONEDORAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO A TRAVÉS DE ENCAPSULADOS E INGESTA ORAL DIRECTA.

*Cerón-Zamora, C., Añorve-Morga, J., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A. y Gonzalez-Olivares, L.G.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Carr. Pachuca - Tulancingo Km. 4.5 Mineral de la Reforma Hidalgo, C.P. 42184

*Autor para correspondencia: carolain.28.03@gmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El huevo de gallina ha sido un alimento muy importante para el hombre desde la antigüedad por lo que su consumo se ha generalizado en todo el mundo [1]. El objetivo de este estudio fue suplementar la alimentación de gallinas ponedoras mediante la suministración de cápsulas de alginato con aceite de pescado para mejorar el perfil nutricional de los huevos producidos sin afectar sus características sensoriales. El estudio se llevó a cabo con 49 gallinas de las estirpes Plymouth Rock y Rhode Island Red, de 18 semanas de edad. Se formaron dos grupos: el grupo control y el grupo suplementado (1 gramo de cápsulas por ave) y por vía oral directa (utilizando jeringa). Transcurridos los 30 días de suplementación por ambos métodos, se inició una etapa de depuración de 60 días para repetir el mismo procedimiento con un nuevo aceite. Al terminar cada tratamiento, se recolectaron aleatoriamente 6 huevos de cada grupo para determinar humedad, cenizas, grasa y proteína mediante técnicas oficiales de la AOAC [2] y los huevos necesarios para el análisis sensorial (prueba de nivel de agrado y prueba triangular) [3]. Para la prueba de nivel de agrado se utilizó una escala hedónica de 7 puntos que se aplicó a 60 jueces no entrenados de entre 17 y 35 años de edad. Los aspectos sensoriales evaluados fueron color en el huevo crudo; color, olor, sabor y textura en huevo cocido y revuelto. La prueba triangular se llevó a cabo utilizando un panel semientrenado conformado por 15 jueces de entre 23 y 35 años de edad. Los datos obtenidos revelan que al incluir aceite de pescado en la dieta de las aves se genera un aumento (1-2 gramos) en la concentración de proteína y una disminución en la concentración de grasa en el huevo (1-4).

Palabras clave: Suplementación; gallinas ponedoras; ácidos grasos omega 3; perfil nutriconal; análisis sensorial.

REFERENCIAS

[1] Institutos de estudio del huevo, "El gran libro del huevo", Madrid: Everest, 2009.
[2] AOAC, "Official methods of análisis", 15th Edición. Washington: Association of Official Agricultural chemists.
[3] B.M. Watts, et al. "Métodos sensoriales básicos para a evaluación de alimentos",Ottawa: International Development Research Centre, 1992.

ESTABILIDAD DE RENDIMIENTO EN GENOTIPOS DE GARBANZO EN LOCALIDADES DEL ESTADO DE SINALOA MEXICO.

[1*]Valenzuela-Herrera, V., [1]Ramírez-Soto, M., [2]Padilla-Valenzuela, I., [1]López-Guzmán, J.A., [1]Pérez-Márquez, J., [3]Ortega-Murrieta, P., y [3]Fierros-Leyva, G.A.

1. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán, Carr. Culiacán-El Dorado Km 16.5. C.P. 80000, Culiacán, Sinaloa.
2. Campo Experimental Norman E. Borlaug. Km 12 Norman E. Borlaug, A.P. 115, Cd. Obregón, Sonora.
3. Campo Experimental Costa de Hermosillo, Pascual Encinas Félix No. 31 Col La Manga, C.P. 83220, Hermosillo, Sonora.

*Autor para correspondencia: valenzuela.victor@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El noroeste de México, se distingue por ser el área productora de garbanzo blanco para exportación donde se produce el grano de mejor calidad reconocido internacionalmente. En el estado de Sinaloa, en el ciclo agrícola 2015-2016 se sembraron en promedio 30, 000 has con un rendimiento promedio de 1.74 ton/ha. El rendimiento y la calidad del grano varían en función de una serie de factores incluyendo el clima, suelo, manejo agronómico, entre otros. Por ello, el objetivo de presente trabajo fue evaluar la estabilidad del rendimiento en líneas y variedades de garbanzo en siete localidades y/o ambientes del estado de Sinaloa. El estudio se evaluó en el Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU) y en terrenos de productores cooperantes en las localidades de Angostura y de Mocorito. Se evaluaron siete líneas avanzadas y variedades de garbanzo en siete localidades. El mejor ambiente de prueba fue Culiacán 2012-2013 con un rendimiento promedio de 3102kg/ha, se pudo observar que la línea CUGA-3105 fue la que presento un mayor rendimiento promedio 2587 kg/ha superando al testigo Blanco Sinaloa 92 con más de 200 kg/ha, además de presentar una mayor estabilidad a través de los diferentes ambientes de prueba, por lo que se le puede considerar como la más estable.

Palabras clave**:** Estabilidad, Rendimiento, *Cicer arietinum* L.

INTRODUCCIÓN

El noroeste de México, que comprende los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, se distingue por ser el área productora de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) blanco para exportación, y es la región donde se produce el grano de mejor calidad en México y el mundo [1,2]. La producción de garbanzo en México, se destina principalmente a la exportación, ya que el garbanzo mexicano tiene un alto precio de venta [2]. México es reconocido en el mercado internacional de garbanzo debido a sus ventajas comparativas y competitivas en cuanto a calidad de grano uniforme, bien procesado y conservado, de gran tamaño (calibres 40-44 granos en 30g).

En el estado de Sinaloa, en el ciclo agrícola 2015-2016 se sembraron en promedio 30,000 has con un rendimiento promedio de 1.74 ton/ha (SIAP, 2017). El rendimiento y la calidad del grano varían en función de una serie de factores incluyendo el clima, suelo, manejo agronómico, entre otros [3]. Por ello, el objetivo de presente trabajo fue evaluar la estabilidad del rendimiento en líneas y variedades de garbanzo en siete localidades y/o ambientes del estado de Sinaloa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se evaluó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU) y en terrenos de productores cooperantes en las localidades de Guamúchil, municipio de Angostura y Potrero de los Sánchez municipio de Mocorito. Las evaluaciones se llevaron a cabo en los ciclos agrícolas Otoño-Invierno 2011-2012, 2012-2013 y 2013-2014. Se consideraron como ambientes; Culiacán 2011-2012, Culiacán 2012-2013 y Culiacán 2013-2014, Potrero 2011-2012 y Potrero 2012-2013, Guamúchil 2012-2013 y Guamúchil 2013-2014.

En todos los casos el ensayo fue establecido durante la primera quincena de noviembre (10 de noviembre), fecha óptima para la siembra del garbanzo en Sinaloa. Se evaluaron las líneas; HOGA-2004-20-6, CUGA-3168, CUGA-3105, CUGA-3096, CUGA 08-743 y las variedades; BLANCO SINALOA-92 (BS-92) y BLANORO como testigos.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue de cuatro surcos de seis metros de longitud y 0.80 m de anchos con una separación de 12 plantas por metro lineal. Se consideró como parcela útil los dos surcos centrales con una longitud de cinco metros para rendimiento de grano. El manejo agronómico se realizó de acuerdo a lo recomendado en el paquete tecnológico del INIFAP [3]. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey 0.05) con el programa SAS ver 9.0.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se puede observar que en lo que respecta a los ambientes, el ambiente con mejor potencial de rendimiento o estable fue el ambiente Culiacán 2012-2013, con un promedio de rendimiento de 3102 kg/ ha con rendimientos que oscilaron entre los 2800 y los 3400 kg/ha respectivamente, en contra parte con el ambiente Culiacán 2013-2014 que presento los valores más bajos con rendimientos de 1642 kg/ha.

En cuanto a los materiales se puede observar que el que tuvo un mejor potencial de rendimiento a través de los ambientes de prueba fue la línea CUGA-3105 que presento un rendimiento promedio de 2587 kg/ha por lo que se le puede considerar la más estable en los ambientes de prueba, esta línea supero al testigo comercial Blanco Sinaloa 92 con más de 200 kg/ha.

Genotipo	Ambiente							Media
	Culiacán 2011-2012	Potrero 2011-2012	Culiacán 2012-2013	Guamúchil 2012-2013	Culiacán 2013-2014	Potrero 2012-2013	Guamúchil 2013-2014	
HOGA-2004-20-6	2418	1802	2829	2082	1626	2330	2321	2201
CUGA-3168	2283	2403	3465	1969	1769	2436	1867	2313
CUGA-3105	2537	2714	3141	2713	1422	2834	2750	2587
CUGA-3096	2486	1400	3054	2541	1940	2211	1453	2155
BLANCO SINALOA92	2431	2284	3051	2193	1488	2591	2117	2315
BLANORO	2211	1705	2933	2732	1391	1172	1930	2047
CUGA 08-743	2475	2669	3242	2062	1798	2801	2314	2480
Media	2406	2155	3102	2327	1642	2339	2108	

CONCLUSIONES

El mejor ambiente de prueba fue Culiacán 2012-2013 con un rendimiento promedio de 3102kg/ha, se pudo observar que la línea CUGA-3105 fue la que presento un mayor rendimiento promedio 2587 kg/ha superando al testigo Blanco Sinaloa 92 con más de 200 kg/ha, además de presentar una mayor estabilidad a través de los diferentes ambientes de prueba, por lo que se le puede considerar como la más estable.

REFERENCIAS

[1] Ortega-Murrieta P.F., P. Manjarrez-Sandoval., G. A. Fierros-Leyva., R. A. Salinas., P. I. Padilla-Valenzuela, E. Gutiérres-Pérez., N. Castillo-Torres. 2013. Blanoro: Nueva Variedad de Garbanzo Blanco para Exportación. INIFAP-Campo Experimental Costa de Hermosillo. Sonora, México. 22 p. (Folleto técnico Núm. 45.).

[2] Gallardo, M. J. 2011. Comercialización y tendencias de precios para el cultivo de garbanzo. Pp 43-57. En: memoria de capacitación. Fundación produce Sinaloa A.C. 60 p.

[3] Salinas, P. R. A., Cortez M. E. y Macías C. J. 2008. Guía para producir garbanzo en el Norte de Sinaloa. INIFAP-CIRNO. Campo Experimental Valle del Fuerte. Folleto Técnico No. 29. Los Mochis, Sinaloa, México. 44p.

[4] Salinas, P. R. A. y Manjarrez S. P. 2007. Manejo agronómico del garbanzo. In: Memoria segundo encuentro regional del sistema producto garbanzo en Sinaloa. Memoria técnica No. 2. SAGARPA-INIFAP 62 p.

COMBO-743 LÍNEA AVANZADA DE GARBANZO BLANCO PROPUESTA PARA SU LIBERACIÓN EVALUADA EN CINCO CICLOS DE CULTIVO EN EL CENTRO DE SINALOA.

[1]*López-Guzmán, J.A., [1]Valenzuela-Herrera, V., [2]Ortega-Murrieta, P.F., [2]Fierros-Leyva, G.A., [1]Ramírez-Soto, M.

1. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán, Carr. Culiacán-El Dorado Km 16.5. C.P. 80000, Culiacán, Sinaloa
2. Campo Experimental Costa de Hermosillo, Pascual Encinas Félix No. 31 Col La Manga, C.P. 83220, Hermosillo, Sonora.

Autor para correspondencia: guzman.jesus@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

El noroeste de México, se distingue por ser el área productora de garbanzo blanco para exportación donde se produce el grano de mejor calidad reconocido internacionalmente. En el estado de Sinaloa, en el ciclo agrícola 2015-2016 se sembraron en promedio 30, 000 has con un rendimiento promedio de 1.74 ton/ha. Una nueva variedad debe presentar las características que demanda el mercado internacional (grano grande, color claro y rugoso), además de presentar características de plantas adecuadas en diferentes sistemas de producción, características que le darán una buena aceptación y un posicionamiento mundial. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento del rendimiento y calibre de grano y porcentaje de exportación, de la línea avanzada COMBO-743 propuestas para su liberación como variedad para el estado de Sinaloa. El presente estudio se evaluó en el Campo Experimental Valle de Culiacán, en los ciclos agrícolas otoño-invierno 2011-2012 al 2015-2016. Se evaluó el rendimiento de grano, porcentaje de exportación y calibre de grano. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey 0.05) con el programa SAS ver 9.0. Los resultados de la línea COMBO-743 presentaron un calibre de grano y porcentaje de exportación muy similar a la variedad BLANCO SINALOA-92 y presento un rendimiento ligeramente mayor, por la cual se propuso su liberación como nueva variedad.

Palabras clave: Calibre de Grano; Rendimiento; *Cicer arietinum* L.

INTRODUCCIÓN

El noroeste de México, se distingue por ser la principal área productora de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) blanco para exportación, y es la región donde se produce el grano de alta calidad en México y el mundo, por ser un grano grande, de color claro y ser rugoso [1, 2]. En el estado de Sinaloa, en el ciclo agrícola 2015-2016 se sembraron en promedio 30, 000 has con un rendimiento promedio de 1.74 ton/ha (SIAP, 2017). El rendimiento y la calidad del grano varían en función de una serie de factores incluyendo el clima, suelo, manejo agronómico, entre otros [3]. En el mercado de exportación del garbanzo, el tamaño o calibre del grano ha sido el principal factor para determinar el valor del producto, entre más grande sea su tamaño el precio es más alto, calibres de grano grueso llegan a valer más del doble que calibres delgados [4]. Para el mercado internacional se requiere de grano blanco grande (calibre 40-44), característica que le ha permitido a la variedad Blanco Sinaloa 92 posicionarse en más de 40 países [5].

Para que una nueva variedad tenga una buena aceptación y posicionamiento a nivel mundial esta debe presentar las características que demanda el mercado internacional, además de presentar características de plantas adecuadas en diferentes sistemas de producción. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento del rendimiento y calibre de grano y porcentaje de exportación, de la línea avanzada COMBO-743 propuestas para su liberación como variedad para el estado de Sinaloa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se evaluó en el Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en los ciclos Otoño-Invierno 2011-2012 al 2015-2016. El ensayo fue establecido durante la primer quincena de noviembre, fecha óptima para la siembra del garbanzo en el centro de Sinaloa. Se evaluó la línea COMBO-743 y la variedad BLANCO SINALOA-92 variedad mayormente sembrada en la región. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue de cuatro surcos de seis metros de longitud y 0.80 m de anchos con una separación de 12 plantas por metro lineal. El manejo agronómico se realizó de acuerdo a lo recomendado en el paquete tecnológico del INIFAP [6].

Se consideró como parcela útil los dos surcos centrales con una longitud de 5 m para evaluar el rendimiento. El porcentaje de exportación se evaluó en un kilogramo de grano por parcela en cribas de orificio redondo de 9 mm. Del total de granos que permaneció sobre la criba se realizó un conteo del número de semillas contenidas en 30 gramos para la variable calibre de grano. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey 0.05) con el programa SAS ver 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se presentan los resultados de la evaluación de la línea propuesta a su liberación y la variedad Blanco Sinaloa 92 evaluada en cinco ciclos agrícolas. Para la variable rendimiento de grano se puede observar que la línea COMBO-743 presento un rendimiento promedio de 2242 kg/ha, y la variedad BLANCO SINALOA 92 presento rendimiento de 2208 kg/ha 1.5 por ciento inferior a la línea COMBO-743.

Cuadro 1. Promedio de rendimiento, calibre y porcentaje de grano de exportación de la línea de garbanzo y la variedad Blanco Sinaloa 92, evaluadas en ensayos de rendimiento en los ciclos agrícolas otoño-invierno 2011-2012 al 2015-2016, en el Campo Experimental Valle de Culiacán.

Línea / Variedad	Rendimiento (Kg/ha)	Calibre de grano	Porcentaje de exportación
COMBO-743	2242	41.7	90.60
BLANCO SINALOA-92.	2208	42.4	90.74

Para la variable calibre de grano se considera la cantidad de granos necesarios para alcanzar un peso de 30 gramos. Para esta variable se puede observar que la línea COMBO-743 cumple con la exigencia del mercado internacional calibre de 40-44 [5]. En cuanto al porcentaje de exportación se puede observar que los dos materiales presentaron un porcentaje de exportación igual 90%. [7], reportan un promedio de 93 % de exportación para la zona de Culiacán. Con base en los resultados anteriormente descritos, se propuso la línea COMBO-743 para su liberación, debido a que presenta un calibre de grano y porcentaje de exportación muy similar a la variedad BLANCO SINALOA-92 y presento un rendimiento ligeramente mayor que el testigo.

CONCLUSIONES

La línea COMBO-743 por presentar buenas características en rendimiento de grano, calibre de grano y porcentaje de exportación, a través de los ciclos de evaluación en ensayos de rendimiento ha sido propuesta para su liberación como nueva variedad para el estado de Sinaloa.

REFERENCIAS

[1] Ortega-Murrieta P.F., P. Manjarrez-Sandoval., G. A. Fierros-Leyva., R. A. Salinas., P. I. Padilla-Valenzuela, E. Gutiérres-Pérez., N. Castillo-Torres. 2013. Blanoro: Nueva Variedad de Garbanzo Blanco para Exportación. INIFAP-Campo Experimental Costa de Hermosillo. Sonora, México. 22 p. (Folleto técnico Núm. 45.).

[2] Gallardo, M. J. 2011. Comercialización y tendencias de precios para el cultivo de garbanzo. Pp 43-57. En: memoria de capacitación. Fundación produce Sinaloa A.C. 60 p.

[3] Salinas, P. R. A., Cortez M. E. y Macías C. J. 2008. Guía para producir garbanzo en el Norte de Sinaloa. INIFAP-CIRNO. Campo Experimental Valle del Fuerte. Folleto Técnico No. 29. Los Mochis, Sinaloa, México. 44p.

[4] Larios Gaxiola Jesús A. 2015. Perspectivas del mercado del garbanzo mexicano de exportación. III Simposio Nacional de Garbanzo. Hermosillo Sonora, México.

[5] Manjarrez, S. P., Gómez G. L., Salinas P. R. A. y Armenta S. J. L. 2004. Blanco Sinaloa 92: Caso exitoso del mejoramiento genético de garbanzo en Sinaloa. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-C.E. Valle de Culiacán. Folleto para productores No. 52. 22p.

[6] Salinas, P. R. A. y Manjarrez S. P. 2007. Manejo agronómico del garbanzo. In: Memoria segundo encuentro regional del sistema producto garbanzo en Sinaloa. Memoria técnica No. 2. SAGARPA-INIFAP 62 p.

[7] Manjarrez-Sandoval, P., Morales-Gómez, J. A., García-Pérez, R. D., Salinas-Pérez, R. A. 2006. Variedades de garbanzo desarrolladas por INIFAP en Sinaloa y Sonora y la importancia de la biotecnología en su protección. In: primer encuentro regional de integrantes del sistema producto garbanzo en Sinaloa. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán, Memoria Núm. 1, Primera Edición, Culiacán Sinaloa, 4-14.

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON ACTIVIDAD MICOTOXIGÉNICA EN ALIMENTO PARA GANADO PROVENIENTE DEL VALLE DE TULANCINGO, HGO.

[1]Avilés-Cabral, H., [1]Ramírez-Montes, S., [1]Jaimez-Ordaz, J., [2]Cruz-Guerrero, A.E., [3]Cruz-Cansino, N.S., [2]Fernández-Perrino, F.J., [1*]Castañeda-Ovando. A.

[1]Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Carr. Pachuca-Tulancingo, km. 4.5. Mineral de la Reforma, Hgo., C.P. 42184
[2]Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México. México. AP 55-355.
[3]Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Nutrición. Ex Hacienda la Concepción s/n Carr. Pachuca-Tilcuautla Tilcuautla, Hidalgo. México. C.P. 42060.

*Autor para correspondencia: ovandoa@uaeh.edu.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN
El objetivo de este trabajo fue identificar los hongos presentes en alimento para ganado vacuno (piensos y concentrados) provenientes del Valle de Tulancingo, Hidalgo, con la finalidad de evaluar la posible contaminación por aflatoxinas. Para este estudio se tomaron muestras de cuatro centros de acopio, que incorporan al 49% de los productores de toda la región. Se analizaron 3 muestras de zacate de maíz, 1 de silo, 1 de alfalfa y 4 de concentrado. Las muestras analizadas presentaron contaminación fúngica elevada, observándose que el contenido de mohos fue más elevado que el de levaduras. Lo anterior pone de manifiesto que hay deficiencia en las prácticas agrícolas y de manufactura en los distintos centros de acopio. Se observó que el proceso de fermentación en los ensilados no es el adecuado, ya que no minimiza el crecimiento fúngico y, por ende, tampoco la posibilidad de la formación de micotoxinas. Las condiciones ambientales y las características de las muestras analizadas favorecen el crecimiento de mohos en ellos, incluidos géneros potencialmente toxigénicos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, lo que ayudaría la presencia de micotoxinas producidas por dichos géneros, con el consecuente riesgo para la salud tanto humana como animal que ello representa.

Palabras clave: Alimento para ganado; silos; hongos; lácteos; aflatoxinas.

INTRODUCCIÓN

En el 2014, el estado de Hidalgo tuvo una producción de 413,097 miles de litros de leche, que representó el 3.71% del total [1,2], ocupando el octavo lugar nacional. Estos datos tienen otras implicaciones, sobre todo las relacionadas con la inocuidad en la cadena de producción de leche y sus derivados, ya que durante ésta pueden ocurrir algunas contaminaciones (de origen químico o microbiológico).

El combate de los hongos de campo está muy ligado al buen manejo de los cultivos durante su desarrollo, lo cual implica el empleo de variedades resistentes a enfermedades y a plagas, el uso

adecuado de fertilizantes y fungicidas y todas aquellas prácticas agrícolas que permitan el desarrollo de plantas sanas y vigorosas, y por último, una cosecha a tiempo y un manejo de postcosecha adecuado [3]. Los hongos de almacén, especies de *Aspergillus* y *Penicillum*, causan diversos daños a los granos y semillas almacenadas, siendo los más sobresalientes la reducción del poder germinativo de las semillas, el ennegrecimiento de los granos y la producción de micotoxinas [3]. Los hongos de deterioro avanzado prácticamente destruyen los granos y productos que invaden debido a su alta capacidad de degradar la materia orgánica y, además, algunos de ellos tienen la capacidad de producir micotoxinas [3].

Actualmente, el combate de estos hongos sólo se logra secando los granos a niveles de humedad desfavorables para su desarrollo; a contenidos de humedad de los granos en equilibrio con humedades relativas menores del 75%. Otra manera de retardar el crecimiento de los hongos es almacenando los granos a bajas temperaturas; sin embargo, el factor más importante es el contenido de humedad de los granos y de los productos almacenados, el cual está en función de la humedad relativa del medio ambiente que lo rodea, tendiendo ambos, la humedad del grano y del ambiente, a equilibrarse [3].

Por otro lado, dentro de los compuestos indeseables que pueden estar presentes en la cadena de producción de lácteos se encuentran las aflatoxinas, que son metabolitos secundarios producidos por el hongo *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nonius*) y que contaminan diversas fuentes de alimentación como los cereales, los productos de panificación, las semillas oleaginosas y los piensos alimenticios, afectando también bioproductos como la carne, el huevo, la leche y sus derivados. La susceptibilidad de los alimentos al ataque de aflatoxinas varía con la ubicación geográfica, la agricultura y las prácticas agronómicas; por lo que, se ha vuelto un problema común, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales [4].

En el estado de Hidalgo existen tres cuencas lecheras de importancia, Tizayuca, Valle del Mezquital y Valle de Tulancingo; a pesar de la importancia que tiene el sector lácteo en este estado, no se cuenta con un registro de la incidencia de hongos con capacidad micotoxigénica en la línea de producción de leche y sus derivados. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de hongos con capacidad toxigénica en muestras de alimento para ganado obtenidas de los principales centros de acopio de las cuencas lecheras del Valle de Tulancingo, Hidalgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron muestras de cuatro centros de acopio, que incorporan al 49% de los productores de toda la región. Se analizaron 3 muestras de zacate de maíz, 1 de silo, 1 de alfalfa y 4 de concentrado (alimento balanceado), las cuales se recolectaron de agosto a noviembre del 2016. La recolección de las muestras se realizó por los técnicos responsables de los centros de acopio, quienes laboran para la Dirección General de Fomento Lechero y se llevó a cabo de forma aleatoria.

En cada muestreo, se recolectaron muestras de entre 250 y 500 g cada una, dependiendo del tipo de muestra a analizar. Todas las muestras recolectadas se recibieron en bolsas de polietileno, se identificaron y se mantuvieron en refrigeración hasta su estudio por un periodo no mayor a 48 horas.

Incidencia de mohos y levaduras

En la Figura 1 se presenta el diagrama de la metodología utilizada a lo largo del estudio.

Recuento de mohos y levaduras

Previo al recuento de mohos y levaduras se realizó el análisis del crecimiento fúngico aparente en las diferentes muestras analizadas, esto se efectuó mediante una inspección visual. Ninguna muestra presentó crecimiento fúngico aparente.

El conteo de mohos y levaduras se expresa como el número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g), que se hacen visibles cuando una alícuota de la suspensión de un producto examinado, ha sido transferida a un medio nutritivo para hongos e incubada aeróbicamente a 25°C por cinco días [5].

Para llevar a cabo el análisis, se pesaron 10 g de cada muestra, a continuación, cada muestra se diluyó en proporción 1:10 en solución salina con Tween 80 y se homogenizó en un Stomacher® durante aproximadamente 2 minutos. Esta dilución se consideró la primera dilución decimal, a partir de la cual se efectuaron 4 diluciones sucesivas, utilizando el mismo diluyente. Se sembró 0.1 mL de cada una de las diluciones de cada muestra, por duplicado, en el medio de cultivo agar papa dextrosa (APD), medio de cultivo recomendado en la NOM-111-SSA1-1994 [6]. Todas las placas sembradas se incubaron durante 5-7 días a 25°C. Trascurrido este tiempo, se procedió al recuento de todas las colonias de mohos y levaduras crecidas.

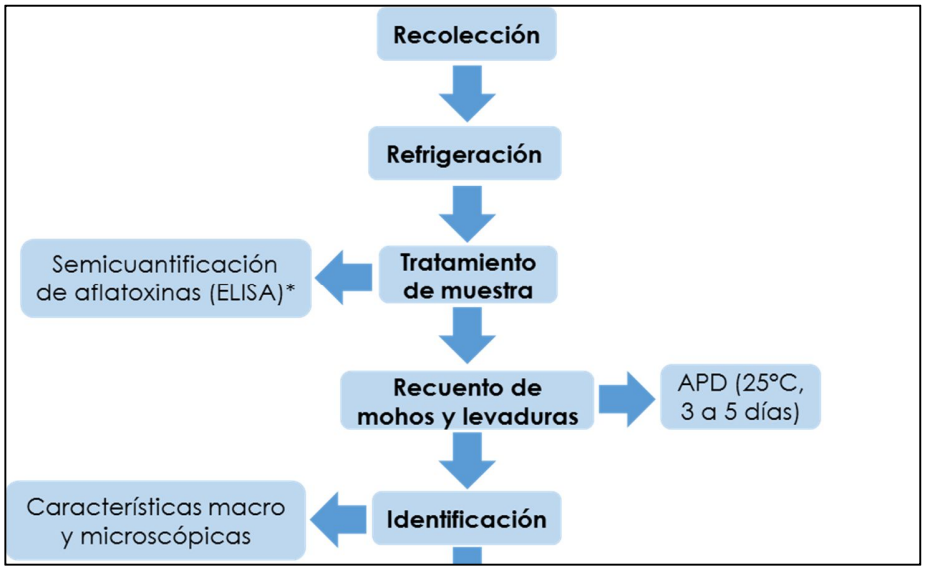


Figura 1. Metodología para el estudio de la incidencia de mohos, levaduras y aflatoxinas totales en muestras de alimento para ganado.

Identificación de colonias fúngicas

La identificación de las colonias fúngicas sólo se llevó a cabo a nivel de género, basados en sus características macroscópicas y microscópicas. El estudio macroscópico se llevó a cabo a simple vista, observando la morfología y la forma de crecimiento de las colonias sobre la superficie del medio. Inmediatamente, se procedió a realizar el estudio microscópico. La preparación de la muestra se efectuó según la técnica de la cinta adhesiva [7], la cual consiste en aplicar una porción de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la colonia y pegarla posteriormente, por presión, sobre un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de azul de metileno.

Las colonias de hongos que no se podían identificar a causa de la ausencia de cuerpos fructíferos, se resembraron en medio Agar Extracto de Levadura (YES) y se incubaron a la misma temperatura, tratando de promover el desarrollo de los mismos. Las colonias que no desarrollaron cuerpos fructíferos después de 7 días de incubación bajo estas condiciones se denominaron como *Mycelia sterilia*.

Para la identificación y clasificación de los hongos, se utilizaron los criterios establecidos por el tratado de Von Arx [8] y el manual de Samson et al. [9].

Criterios de identificación

Tras siete días de incubación se procedió a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos. Para las características macroscópicas se tomaron en cuenta parámetros como: coloración del anverso y reverso de las colonias, textura de las colonias y presencia de pigmento difundido. Los principales parámetros microscópicos tomados en consideración fueron: forma de los cuerpos fructíferos, forma, disposición y ornamentación de las esporas, forma y tamaño de las ascosporas (si las había).

Aislamiento de colonias fúngicas potencialmente micotoxigénicas

Paralelamente al recuento, se realizó el aislamiento e identificación de aquellas colonias que, a simple vista o mediante su observación al microscopio se consideraron pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Mediante un asa de platino se depositó un inóculo de esporas en tres sitios distintos (formando un triángulo equilátero (Figura 2) de la placa de petri con 30 mL del medio de cultivo y se incubó a 25°C, durante el tiempo requerido para el desarrollo óptimo de la colonia fúngica. Se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener cultivos puros. Cada cepa se aisló por duplicado.

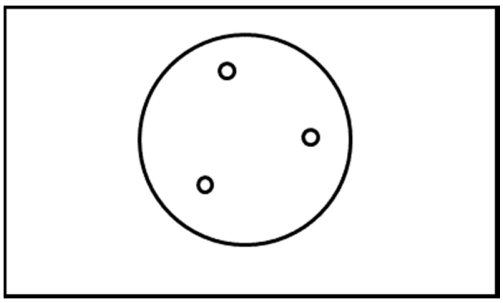


Figura 2. Depósito del inóculo de esporas sobre la superficie del medio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, las muestras analizadas presentan contaminación fúngica elevada ya que presentaron altos recuentos de mohos y levaduras (superiores a 5 log UFC/g). En la mayoría de los casos, el recuento de mohos fue más elevado que el de levaduras, excepto para las muestras de silo provenientes del centro de acopio ubicado en Almoloya. Lo anterior pone de manifiesto que las prácticas agrícolas y de manufactura en la región analizada, así como en los distintos centros de acopio, no son adecuadas para un correcto mantenimiento del alimento destinado a la alimentación de ganado vacuno.

Del mismo modo, se observó que el proceso de fermentación llevado a cabo en los ensilados no es el adecuado pues en caso de serlo, minimizaría el crecimiento fúngico y, por ende, la posibilidad de la formación de micotoxinas.

Los problemas ocasionados por la contaminación fúngica y la posible presencia de aflatoxinas en alimentos destinados a la alimentación animal han sido poco estudiados hasta el presente en México y en particular en la zona de estudio (Hidalgo). Sin embargo, a nivel global y particularmente en regiones de clima cálido templado, se ha sabido de problemas de micotoxicosis originados como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas.

Tabla 1. Géneros fúngicos presentes en las diferentes muestras del centro de acopio: La Paila, Singuilucan (Valle de Tulancingo).

Género fúngico	**Muestras**							
	Zacate de maíz		**C-P1**		**C-P2**		**C-P3**	
	NC	**%**	**NC**	**%**	**NC**	**%**	**NC**	**%**
Graphium	65	24.34	0	0	0	0	0	0
Verticillium	85	31.84	0	0	0	0	0	0
Scedosporium	22	8.24	0	0	0	0	0	0
Mycelia sterilia	14	5.24	4	8.90	4	33.33	0	0
No identificado	81	30.34	16	35.56	1	0	104	30.41
Streptomyces	0	0	1	2.22	0	0	0	0
Blastomyces	0	0	1	2.22	0	0	0	0
Fusarium	0	0	2	4.44	0	0	120	35.09
Aspergillus	0	0	2	4.44	0	0	0	0
Coccidioides	0	0	1	2.22	0	0	0	0
Penicillium	0	0	1	2.22	4	33.33	1	0.29
Phialophora	0	0	1	2.22	0	0	0	0
Cladosporium	0	0	18	40	0	0	7	2.05
Paecilomyces	0	0	0	0	0	0	110	32.16
Exophiala	0	0	0	0	0	8.33	0	0
Nocardia	0	0	0	0	1	8.33	0	0
Trichoderma	0	0	0	0	1	8.33	0	0

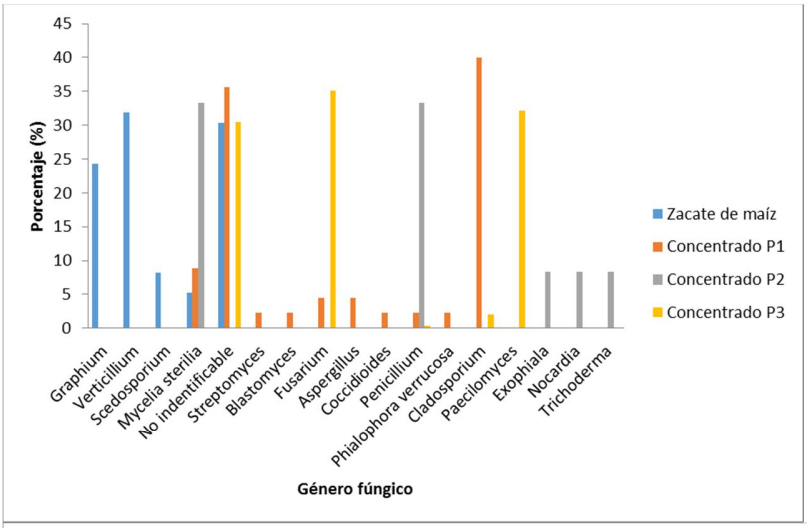
NC: Número de cepas contadas del total de mohos. C:concentrado, P1:productor 1, P2:productor 2 y P3:productor 3.

Aunque en los rumiantes las micotoxinas no son consideradas como causantes de complicaciones mayores de salud, se sabe que estos metabolitos reducen la productividad de los mismos (provocan alteraciones en la reproducción, así como en el sistema inmunológico) y ocasionalmente, la muerte.

Un problema grave asociado con la presencia de micotoxinas en alimentos destinados a la alimentación del ganado es que el reconocimiento de micotoxicosis es sumamente difícil de diagnosticar. Esto aunado a la ausencia de protocolos estructurados para el análisis de casos sospechosos agravan el problema, ya que las micotoxinas podrían pasar a los productos derivados, con el consiguiente riesgo para la salud humana.

Los resultados observados hasta el momento muestran la necesidad de continuar realizando estudios relacionados con la presencia de mohos y micotoxinas en alimentos destinados al consumo de ganado vacuno en el estado de Hidalgo pues al parecer, las prácticas agrícolas, las condiciones ambientales y las características de las muestras analizadas favorecen el crecimiento de mohos en ellos, incluidos géneros potencialmente toxigénicos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Lo anterior también favorece, al menos teóricamente, la presencia de micotoxinas producidas por dichos géneros, con el consecuente riesgo para la salud tanto humana como animal que ello representa.

En la Tabla 1 se muestran los géneros fúngicos identificados en las diferentes muestras provenientes del Centro de Acopio La Paila ubicado en Singuilucan. En la Figura 3A se observa que el género *Cladosporium* fue el que presentó mayor incidencia en estas muestras, aunque también hubo un elevado porcentaje de géneros no identificables, encontrándose tres géneros toxigénicos en las muestras correspondientes a concentrados.



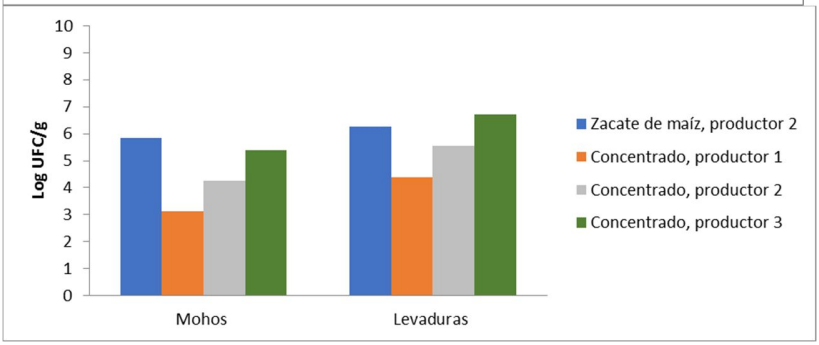


Figura 3. Análisis microbiológico de las muestras provenientes del centro de acopio La Paila, Singuilucan (Valle de Tulancingo). (A) Porcentaje de Géneros fúngicos. (B) Cantidad (UFC/g) de mohos y levaduras de las diferentes muestras al quinto día de incubación.

En el caso del zacate de maíz la población de mohos fue mayor que la de los concentrados, pero a diferencia de ellos no se observó ningún hongo toxigénico. En la Figura 3B, se observa que hubo mayor contaminación por levaduras que por mohos.

De acuerdo a la literatura consultada, el maíz y los subproductos destinados al consumo animal son considerados de alto riesgo por la contaminación con aflatoxinas, producidas principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nonius* [3], pero en el Centro de Acopio La Paila no se identificó ningún moho aflatoxigénico en la muestra de zacate de maíz; sin embargo, en los concentrados sí se detectó la presencia de dichos mohos, por lo que las condiciones de almacenamiento y manejo del alimento no fueron las adecuadas para evitar su crecimiento.

CONCLUSIONES

Las prácticas agrícolas, de manufactura y las condiciones ambientales son inadecuadas o insuficientes para el mantenimiento correcto del alimento destinado a la alimentación del ganado vacuno en el Valle de Tulancingo, Hidalgo.

Las características intrínsecas de algunas de las muestras analizadas favorecen el crecimiento de mohos, incluyendo géneros potencialmente toxigénicos, lo que aumenta el riesgo de la presencia de micotoxinas, que representan un riesgo para la salud humana y animal.

Se debería continuar realizando estudios sobre la presencia de mohos y micotoxinas en alimentos para el consumo de ganado vacuno en el estado de Hidalgo, ya que las muestras analizadas exceden los límites que marca la normativa mexicana.

Aparentemente, el proceso de ensilaje no es adecuado, ya que el crecimiento fúngico no se ve afectado por este tratamiento y, por consiguiente, la posibilidad de la formación de micotoxinas sigue presente.

REFERENCIAS

[1] Secretaría de Economía, Dirección General de Industrias Básicas. (2012). Análisis del sector lácteo en México. Secretaría de Economía:México.

[2] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, "Boletín de leche enero-marzo 2015", SAGARPA:México, 2015.

[3] M. E. Moreno, "Manual para identificación de hongos en granos y sus derivados", UNAM. México, 1988 107 p.

[4] A. Filazi, and T. U. Sireli, "Occurrence of Aflatoxins in Food", In: Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects, M. Razzaghi-Abyaneh, Ed. InTech, 2013, pp. 143-170.

[5] ICC (The International Association for Cereal Science and Technology), Determination of the fungus germ count (plate count methods) in cereals, cereals products, and animal feed. General Principles of the available ICC Standards Methods, ICC standard No. 134, 1980.

[6] NOM 111-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos, Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

[7] J. L. Rodríguez-Tudela and P. Aviles, "Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture", J. Clin. Microbiol., vol. 29, pp. 2604-2605, 1991.

[8] J. A. Von Arx, "The genera of fungi sporulating in pure culture", 3rd. edition, Vaduz, Germany, 1981.

[9] R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad and O. Filtenborg, "Introduction to Food and Airborne Fungi". Wageningen:CBS, 2000.

CONSTRUCCIONES PARA LA SOBREEXPRESIÓN DE miRNAs PREFERENTES EN SOLANÁCEAS.

Téllez-Valerio, C.E., Martínez-Núñez, M., Ruiz-Rivas, M., Luna-Suárez, S. y *Rosas-Cárdenas, F.

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México.

*Autor para correspondencia: fatyrosas@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son secuencias de RNA de 21 nt de longitud que regulan la expresión génica en eucariontes. Análisis de secuenciación masiva han revelado que existen miRNAs altamente expresados y conservados en plantas, pero también miRNAs de baja abundancia que se expresan preferentemente en algunas especies. Chávez y col. [1] presentan un estudio de identificación y abundancia de miRNAs en diversas plantas que incluye helechos, gimnoespermas, agiospermas basales, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Dentro de los grupos de miRNAs que identifican, existe un grupo de miRNAs que muestra una abundancia preferentemente en la familia solanácea. Este comportamiento sugiere que los miRNAs con una abundancia alta en familias especificas pueden tener un papel relevante en cada familia. Las solanáceas son de gran importancia, debido a su amplia diversidad, distribución y además son usados como plantas de cultivo generando un impacto en la economía. En la familia solanácea, se han identificado miRNAs de los cuales la información en torno a su función es limitada. En el presente trabajo, se pretende realizar la construcción para la sobreexpresión de miRNAs expresados preferencialmente en solanáceas. Por lo que se realizó la identificación y selección de miRNAs utilizando herramientas bioinformáticas, que incluyeron la base de datos miRBase, y los programas psRNAtarget y BLAST. Con base en el número de lecturas, conservación y blancos para cada miRNA, se eligieron los miRNAs miR5300, miR5301 y miR6024 para generar construcciones de sobreexpresión. Para ello, se amplificó el precursor de cada miRNA a partir de DNAg. Las construcciones de sobreexpresión se realizaron mediante la tecnología GATEWAY®. Se utilizó el vector pENTR-D-TOPO como vector de clonación y el vector de sobreexpresión pB7WG2D con el promotor constitutivo 35S, como vector destino. Cada una de las contrucciones fue validada por PCR, digestión, tanto en el vector de entrada como en el vector destino y finalmente validadas pos secuenciación de sanger en el vector destino. Una vez validadas las construcciones, células de Agrobacterium fueron transformadas con la construcción de sobreexpresión. Actualmente, se ha terminado las construcciones de sobreexpresión para cada miRNAs, lo que permitirá generar plantas transgénicas sobreexpresoras de cada miRNA con la finalidad de conocer la función de los miRNAs expresados preferentemente en solanáceas.

Palabras clave: miRNAs; sobreexpresión de miRNAs; solanáceas,

REFERENCIAS

[1] Chávez Montes RA, Rosas-Cárdenas F de F, De Paoli E, et al. 2014. Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. Nat Commun 5:3722. doi: 10.1038/ncomms4722.

IDENTIFICACIÓN DE LOS PRIMEROS miRNAs DE AMARANTO Y SU POSIBLE FUNCIÓN EN EL DESARROLLO.

Martínez-Núñez, M., Vázquez-Portillo, R.E., López-Maldonado, S., Téllez-Valerio, C.E., Vera-Hernández, P.F., Ruiz-Rivas, M., Luna-Suárez, S. y *Rosas-Cárdenas, F.

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México.

*Autor para correspondencia: fatyrosas@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El amaranto es un pseudocereal con un alto valor nutrimental y propiedades nutracéuticas notables, se valora por ser una planta con tolerancia inherente a diferentes factores de estrés pues es poco susceptible a enfermedades o plagas, además de que es capaz de crecer en condiciones adversas (Das, 2016). Las plantas han desarrollado estrategias sofisticadas para enfrentar condiciones climáticas adversas. Entre sus mecanismos de defensa se encuentra la reprogramación de la expresión génica mediada por microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son una clase de RNAs pequeños no codificantes de aproximadamente 21 nt, los cuales se han identificado como importantes reguladores de la expresión génica, por la interacción específica con mRNAs blanco en múltiples organismos. Algunos miRNAs están conservados a través de diferentes especies de plantas [1]. En el presente trabajo, se realizó la búsqueda bioinformática de miRNAs en el genoma y/o transcriptomas de amaranto y se comenzó su validación por técnicas moleculares con la finalidad de elucidar las redes de regulación génica de amaranto donde participan dichos miRNAs. Primero, se realizó la búsqueda y colecta de datos de los miRNAs presentes en el genoma de amaranto, así como la predicción de posibles precursores de miRNAs en amaranto. Para la validación de los miRNAs, se realizó la siembra y colecta de material vegetal, la extracción de DNA y RNA. Posteriomente, se realizó la sintesis de cDNA RT-PCR de diferentes etapas de desarrollo de amaranto. Para analizar la expresión de cada uno de los miRNAs, se llevó a cabo una RT-PCR con el cDNA de diferentes tejidos y etapas de desarrollo de amaranto. Para qRT-PCR se utilizó el sistema y software StepOnePlus. Para tiempo real todos los PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C and 1 min at 60°C. la información fue integrada para predecir la posible función de los miRNAs analizados en amaranto.

Palabras clave: miRNAs; amaranto; desarrollo de plantas; función de miRNAs.

REFERENCIAS

[1] Chávez Montes RA, Rosas-Cárdenas F de F, De Paoli E, et al. 2014. Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. Nat Commun 5:3722. doi: 10.1038/ncomms4722.

HOMOLOGÍA Y PRESENCIA DE BETANIDINA GLUCOSILTRANSFERASA Y CHALCONA SINTASA EN PLANTAS POR MEDIO DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

*Díaz-Serrano, C.I.G. y Brena-Becerril, A.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 # 595 carretera Tlajomulco-Santa Fe, Lomas de Tejeda. Tlajomulco de Zúñiga Jal. México.

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

La betanidina glucosiltransferasa (betanidin 5 glucosyltransferase) es una enzima catalizadora que se encarga de la formación de los derivados de las betacianinas. Las betacianinas son pigmentos vegetales de color violeta que absorben la luz verde, uno de los grupos en los que se dividen las betalaínas. Las antocianinas son otro grupo importante de pigmentos vegetales, otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. La chalcona sintasa (chalcone synthase), otra enzima catalizadora que pertenece a la familia de los policétido sintasa (PKS), es sumamente importante para la síntesis de este segundo grupo de pigmentos vegetales. Ambos tipos de pigmentos son mutuamente excluyentes. En este trabajo se utilizaron cinco secuencias diferentes, cuatro caracterizando la betanidina glucosiltransferasa y la quinta la chalcona sintasa para encontrar homologías en diferentes especies vegetales, con el fin de relacionar entre sí de manera evolutiva, y, con herramientas bioinformáticas los individuos del reino Plantae que presenten el gen codificante para alguno de estos dos grupos de enzimas. El proyecto se desarrolló durante la clase de bioinformática en la Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Periodo mayo – agosto de 2017. Mediante la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se encontró y seleccionó la secuencia 001149508.1 (Zea Mays) como sonda para chalcona sintasa. Para la betanidina glucosiltransferasa, también mediante la base de dados del NCBI se seleccionaron cuatro secuencias como sonda AFV60740.1 (Rivina humilis), AAL57240.1 (Cleretum bellidiforme), CAB56231.1 (Cleretum bellidiforme), AAT93861.1 (Oryza sativa Japonica Group). Haciendo uso del algoritmo BLASTP y cada una de las secuencias sondas, se encontraron 14 secuencias homologas a la secuencia 001149508.1, y 5 secuencias por cada secuencia sonda para la chalcona sintasa. Se realizó una edición de los datos obtenidos sobre cada colección de secuencias (14 y 20), directamente en blog de notas. Los alineamientos múltiples y los árboles de mínima evolución fueron construidos mediante ClustalX2, BioEdit y Mega4. Tanto en la colección de secuencias para betanidina glucosiltransferasa y chalcona sintasa se presentó una secuencia perteneciente a Zea Mays, lo cual se trata de un evento raro, teniendo en cuenta el hecho de que los pigmentos vegetales productos de la síntesis en las que participan las dos enzimas de interés en este trabajo, son, mutuamente excluyentes.

Palabras clave: betanidina glucosiltransferasa; chalcona sintasa; bioinformática; comparación; reino Plantae; pigmentos vegetales.

REFERENCIAS

[1] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). "Basic Local Alignment 11 Search Tool", J. Mol. Biol.(215), 403-410.

[2] Y. Tanaka, N. Sasaki y A. Ohmiya, "Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids", The Plant Journal, vol. 54, págs. 733-749,2008.

[3] F. Gárcia Carmona, F. Gandía Herrero y J. Escribano, "Flores fluorescents", INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, págs. 50-57, Abril, 2011.

ANÁLISIS FUNCIONAL PRELIMINAR DE UN CANAL DE CLORO MODULADO POR LIGANDO, EN LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.*

[1]Barragán-Álvarez, C.P., [1]Marino-Marmolejo, E.N., [1]Gutiérrez-Ortega, A., [1]Padilla-Camberos, E., [2]Barajas-López, C., [2]Espinosa-Luna, R., y [1*]Martínez-Velázquez, M.

[1] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC. División de Biotecnología Médica y Farmacéutica. Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, México.
2. División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, 78216, San Luis Potosí, SLP, México.

*Autor para correspondencia: cpba77@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN
La garrapata *Rhipicephalus microplus*, es considerada como el ectoparásito de mayor importancia a nivel mundial, ésta afecta a la industria ganadera generando pérdidas económicas importantes; como principal método de control de la garrapata se utilizan acaricidas químicos, destacando a la Ivermectina (IVM) que activa canales iónicos de cloro regulados por ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato y glicina. Hallazgos recientes muestran la expresión de un gen que codifica para un receptor tipo glicina (RmGlyR) en la garrapata *R. microplus*, que presenta características comunes a las subunidades de la familia de receptores Cys-loop. En el presente trabajo se reporta la caracterización molecular de una variante del gen de este receptor tipo glicina (RmGlyRv); ambas variantes se utilizaron para estudios de expresión heteróloga en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, a fin de evaluar su funcionalidad, utilizando los agonistas GABA, glicina y glutamato, se mostraron bajas corrientes al aplicar el agonista glutamato y sin cambios en la corriente, al co-aplicar el agonista alostérico IVM, esto sugiere que el receptor no es capaz de formar un canal homomérico funcional, es necesario realizar más estudios para verificar si se requiere la presencia de otra subunidad para obtener un canal funcional.

PALABRAS CLAVE
Garrapata; Canales de cloro; *Rhipicephalus microplus*; Ivermectina.

INTRODUCCIÓN

La garrapata *R. microplus*, se considera como el ectoparásito de mayor importancia a nivel mundial, que afecta a la industria ganadera en zonas tropicales y subtropicales, generando pérdidas económicas importantes, principalmente por los daños que provoca este ectoparásito en los bovinos, resaltando la pérdida de sangre, reducción en la ganancia de peso, disminución de la producción de leche, inmunosupresión y deterioro en las pieles. Además, es vector de agentes causales de las enfermedades babesiosis y anaplasmosis [1]–[4]

Debido a la importancia económica y sanitaria que tiene la garrapata *R. microplus* existe una campaña en México que se avoca principalmente al control de esta especie, observándose que, a pesar de los

esfuerzos para controlar la plaga, sigue implicando un problema que afecta gran parte del territorio nacional[4], [5].

Actualmente el principal método de control de la garrapata es la aplicación de acaricidas químicos, como son los compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas, piretroides y lactonas macrocíclicas [6], [7].

Dentro del grupo de las lactonas macrocíclicas usadas en el control de la garrapata, se encuentra la Ivermectina (IVM). La IVM es una lactona macrocícilica que se utiliza en contra de una amplia gama de endoparásitos (nemátodos) y ectoparásitos (insectos y ácaros), presentes en animales y seres humanos; actúa modulando alostéricamente receptores específicos de neurotransmisores de las neuronas motoras periféricas. Se sabe que la IVM activa canales iónicos de cloro regulados por ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato (GluCl) y glicina, causando parálisis de la función motora, inhibición de la alimentación, reproducción y finalmente la muerte. Su sitio de unión es en la interfaz de dos subunidades adyacentes del receptor, se ubica entre el alfa hélice del pase transmembranal 3, en la subunidad principal (+) y en el alfa hélice del pase transmembranal 1 de la subunidad complementaria (-) y establece contacto también con el pase transmembranal 2, que es el encargado de formar el canal. Un residuo de glicina en la posición 281 del pase transmembranal 3 es esencial para la selectividad a IVM [8]–[13] . El uso indiscriminado de acaricidas como la IVM ha generado poblaciones de garrapatas resistentes, reportes en México, Brasil y Uruguay, muestran que la incidencia de resistencia ha incrementado considerablemente [8], [14], [15] .

En la garrapata *R. microplus* sólo se han caracterizado molecular y funcionalmente dos receptores que forman canales iónicos de cloro, un receptor GABA y un canal de cloro activado por glutamato (GluCl) [16]. Hallazgos recientes muestran la expresión de un receptor tipo glicina en la garrapata *R. microplus.* Esta secuencia tiene un marco de lectura abierto de 1392 pb que codifica para una proteína de 464 aminoácidos; este receptor contiene características comunes a las subunidades que conforman los pLGICs, como lo es un dominio amino-terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales y un bucle grande extracelular que se forma por la unión de dos cisteínas englobando 13 aminoácidos (característico de la familia de receptores Cys-loop). El polipéptido caracterizado, aparentemente no contiene péptido señal. Conserva un residuo de glicina en el tercer dominio transmembranal, el cual, en otros estudios se ha visto que es esencial para la alta sensibilidad a la IVM [17].

El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis funcional preliminar de un canal de cloro modulado por ligando, recientemente reportado en la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Se reporta la caracterización molecular de una variante del gen de este receptor tipo glicina (RmGlyRv), que guarda identidad del 92 % con el receptor previamente reportado; sin embargo, se encontraron variaciones específicas en el extremo 5´, como lo es la predicción de péptido señal y cambios de algunos aminoácidos. Los resultados mostraron que la secuencia cuenta con un marco de lectura abierto de 1401 pb que codifican para 467 aminoácidos, no contiene metionina como codón inicial y conserva características propias de una subunidad de la familia de receptores Cys-loop. Adicionalmente presenta un residuo de glicina en el tercer paso transmembranal necesario para la selectividad a IVM.

Se realizó la expresión heteróloga en ovocitos de rana *Xenopus leavis*, de las variantes del receptor putativo de glicina, y se hizo el registro de corrientes al aplicar los agonistas GABA, glicina y glutamato, mostrando bajas corrientes al aplicar el agonista glutamato y sin cambios en la corriente, al co-aplicar el agonista alostérico IVM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recursos bioinformáticos.

Se utilizó el Servicio BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, USA), así como el programa Primer 3, la herramienta Translate en ExPaSy, el programa TMHMM, Clustal W, TMRPres2D, el programa signalP 4.1 y la herramienta ProtParam ExPASy.

Obtención de garrapatas y tejidos.

Se colectaron garrapatas hembras repletas adultas, *R. microplus* de bovinos ubicados en el rancho La Media Joya en Tapalpa, Jalisco, México. Las garrapatas se colocaron en cajas Petri dentro de una incubadora a temperatura de 27° C y humedad relativa del 85%, para su ovoposición. Se obtuvieron huevos de un día y larvas de 12 días. Los tejidos de ovario e intestino se obtuvieron mediante disección.

Extracción de ARN total y síntesis de ADNc.

Para la extracción de ARN total se pesaron 100 mg de huevo, larva, así como de cada tejido adulto y se añadió 1 ml de TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La síntesis de ADNc se realizó a partir de 4.5 µg de ARN total, empleando el Kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

Caracterización de la secuencia codificante completa, RmGlyRv.

Para obtener la secuencia codificante completa de la variante del receptor tipo glicina (RmGlyRv), se tomó como referencia las secuencias EST777211 (CK187896.1) y EST777210 (CK187895.1), de la base de datos de ESTs (por sus siglas en inglés Expressed Sequence Tag) de *R. microplus*, las cuales guardan identidad con la secuencia del receptor tipo glicina (*RmGlyR*, KJ476181).

La amplificación de la subunidad completa de la variante RmGlyRv se logró mediante el diseño del oligonucleótido forward F-RmGlyRv (AGTGGCAAGACCGGAAGAA) que alineaba en la región 5' de la secuencia EST777211, y el oligonucleótido reverse R-RmGlyRv (TCAGGTGAACTCGCTCATGT) que alineaba en la región 3' de la secuencia EST777210. La reacción de PCR se realizó empleando ADNc de tejido de ovario bajo las siguientes condiciones de amplificación: 95 ºC/5 min; 35 ciclos de 95 °C/30 s, 57 °C/30 s y 72 °C/1 min; finalmente 72 °C/10 min. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager - Bio-Rad).

Síntesis de ARNm *In vitro*

Para la síntesis de ARNm *in vitro* se utilizó como templado el vector de expresión pcDNA™3.1/*myc*-His A (Mammalian Expression Vector), que contenía la secuencia del receptor tipo glicina, ya fuese *RmGlyR* o *RmGlyRv*. Se realizó la linearización del vector utilizando enzimas de restricción, seguido de purificación. Se tomó el ADN linearizado y purificado, para iniciar la síntesis del ARNm con mMessage mMachine T7 ultra kit (Life Technologies, Texas, USA).

Microinyección de ARNm y registros electrofisiológicos

La evaluación fisiológica del receptor se llevó a cabo en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, a través de la técnica electrofisiológica "Voltage Clamp". Inicialmente se realizó cirugía a una hembra adulta de la especie *X. laevis*, para la extracción de los ovocitos. Se seleccionaron ovocitos en estadio de maduración V y VI, que fueron defoliculados de forma manual.

Previo a la inyección el ARNm se desnaturalizó, incubándolo a una temperatura de 70 ºC durante 3 minutos; posteriormente se mantuvo en hielo. La microinyección se hizo en el citoplasma del ovocito, en el polo claro, utilizando ARNm de RmGlyR, ARNm de RmGlyRv y una mezcla de ambas variantes. Después de la inyección, se incubaron los ovocitos en solución Barth a 14 ºC hasta su uso (12-36 horas), previo a los experimentos electrofisiológicos.

Se realizaron los registros de corriente de membrana con dos electrodos, usando un amplificador Axoclamp 2B (Axon instruments), conectado a un convertidor análogo a digital MiniDigi 1A y el programa AxoScope 9.2 (Axon Instruments, Molecular Devices, Foster City, CA).

Los ovocitos se colocaron en una cámara de plástico, donde se realizaron los registros electrofisiológicos. Se observaron con estéreomicroscopio para colocarlos con el polo claro hacia arriba y ponerlos en contacto con los electrodos, utilizando un micromanipulador (WR-88; Narishigue Scientific Instrument Lab, Tokyo Japan).

Se prepararon stocks de soluciones de los agonistas a una concentración de 200 mM de Ivermectina, GABA, glicina y glutamato (Sigma-Aldrich). La aplicación de las soluciones se realizó mediante un sistema de perfusión con 8 tubos, en donde se colocó solución externa para lavar los ovocitos, después de agregar las soluciones de los agonistas.

Se probaron diferentes concentraciones de los agonistas GABA, glicina y glutamato, para evaluar la funcionalidad del receptor putativo de glicina y su variante. Las concentraciones utilizadas de cada agonista fueron: 10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM, 25 mM, 35 mM, 50 mM, 100 mM y 150 mM. De igual manera se probó la combinación de los agonistas previamente mencionados a 1 mM y 50 mM con IVM a una concentración de 10 µM, 50 µM y 100 µM.

Después de la aplicación de los agonistas se realizaron lavados de 5 minutos con solución externa, para remover la sustancia y poder realizar otra aplicación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la secuencia RmGlyRv, variante del receptor tipo glicina.

Para determinar la secuencia codificante completa de *RmGlyRv*, se realizó una PCR con los oligonucleótidos F-RmGlyRv y R-RmGlyRv, donde se obtuvo un fragmento de ~1400 pb (Fig. 1A), el cual fue clonado en el vector pCR™4-TOPO® TA y se confirmó la presencia del inserto mediante digestión (Fig. 1B). Con base en el análisis de los resultados de secuenciación, *RmGlyRv* cuenta con un marco de lectura abierto de 1401 pb que codifican para 467 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 52.86 kDa y un punto isoeléctrico de 8.32. No contiene metionina como codón inicial, lo que coincide con la secuencia *RmGlyR* reportada previamente por Flores y cols.[17], con la que guarda un 92% de identidad, y muestra las características propias de una subunidad que conforman los pLGICs, tales como un

dominio N-terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales y un bucle que se forma por la unión de dos cisteínas (Fig. 2).

Los alineamientos muestran identidad con los pLGICs caracterizados en *R. microplus*, 32% con el GluCl y 29 % con el receptor GABA (Fig. 3). Se predijo la presencia de péptido señal con un tamaño de 29 aminoácidos (WQDRGRKDSTVRWLLLCASCLAVQLACSV) (Fig. 4A). Después del corte del péptido la proteína cuenta con un extremo N-terminal extracelular de 239 aminoácidos (aa), cuatro hélices transmembranales con 22 aa cada una de ellas a excepción de la 2ª que contiene 23 aa. Dos regiones intracelulares, la primera de 5 aa y la segunda de 55 aa, una región extracelular intermedia de 13 aa y un C-terminal extracelular de 4 aa (Fig. 4B). Estos resultados muestran la existencia de una variante del receptor tipo glicina, previamente reportado por Flores y cols.[17], el cual también posee el residuo de glicina en el tercer pase transmembranal que tentativamente le conferiría sensibilidad a IVM, así como el motivo PAR para la selectividad a iones cloro, pero que además se predice péptido señal (Fig. 2).

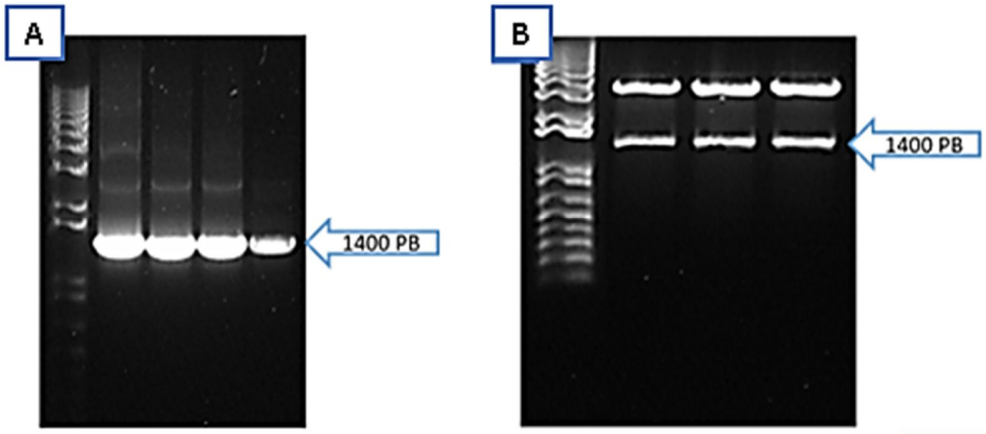


Figura 1. (A) PCR de la secuencia codificante de la variante RmGlyRv. F-RmGlyRv y R-RmGlyRv, aproximadamente ~1400 pb (B) Confirmación de la clonación de la secuencia, en el vector pCR® 4-TOPO®, liberación del fragmento ~1400 pb, Colonias 4,5 y 6.

En la garrapata *R. microplus,* se ha asociado la resistencia a dieldrina con una mutación presente en el receptor de GABA [18]. Así mismo estudios de fisiología en GluCls, muestran que estos canales están relacionados directamente con el mecanismo de acción de las lactonas macrocíclicas (familia a la cual pertenece la IVM) [19]. En países como México, Brasil, y recientemente Uruguay, se han observado poblaciones de *R. microplus* resistentes a IVM [8], [14], [20]. No obstante, a la fecha se tiene poco conocimiento sobre blancos moleculares de la IVM y sobre los mecanismos a través de los cuales se genera resistencia a este acaricida en la garrapata *R. microplus*.

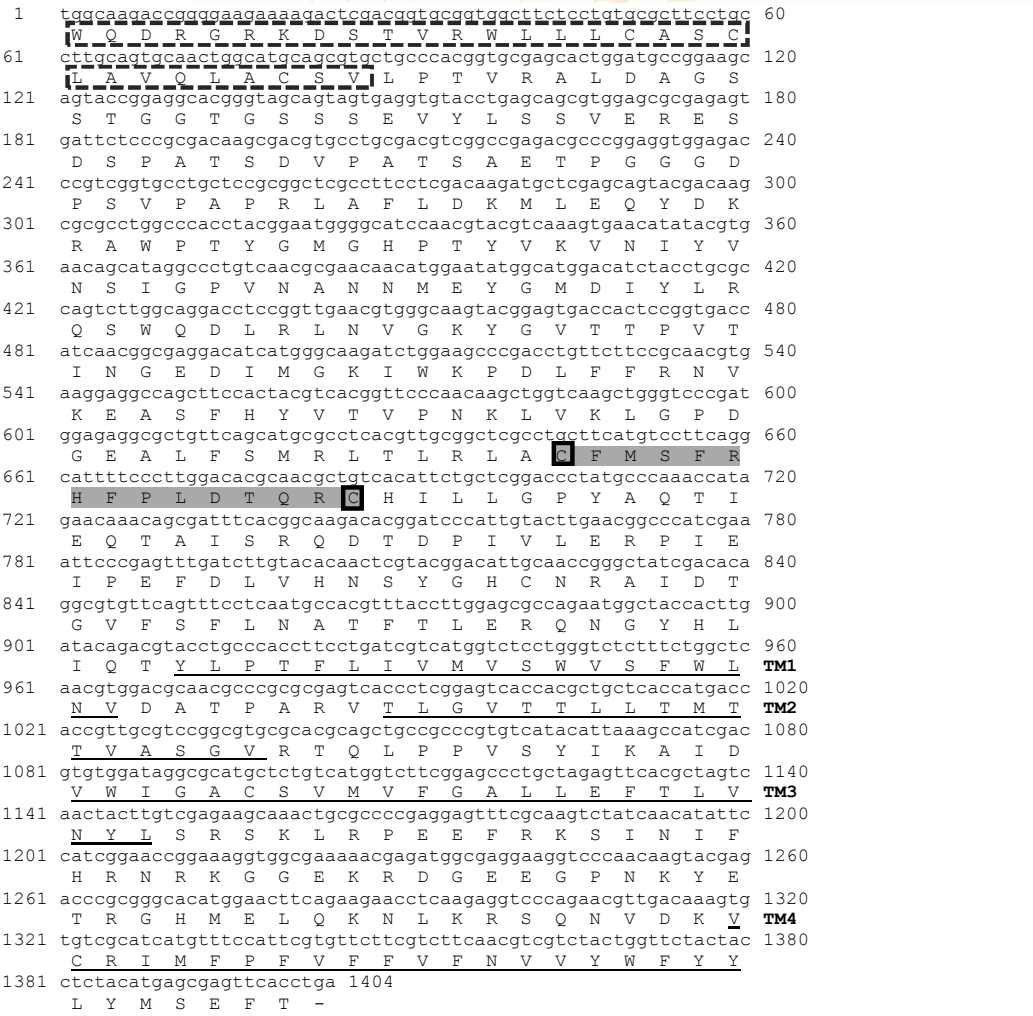


Figura 2. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida de la variante del receptor tipo glicina de *R. microplus* (*RmGlyRv*). Se marca en un rectángulo con líneas punteadas el péptido señal. Se remarca en color gris el bucle característico de la familia Cys-loop y se resaltan con un cuadro las cisteínas que lo forman. Se subrayan los cuatro pases transmembranales y se indica al lado derecho el número del pase transmembranal (TM1-TM4). El guion indica el codón de paro.

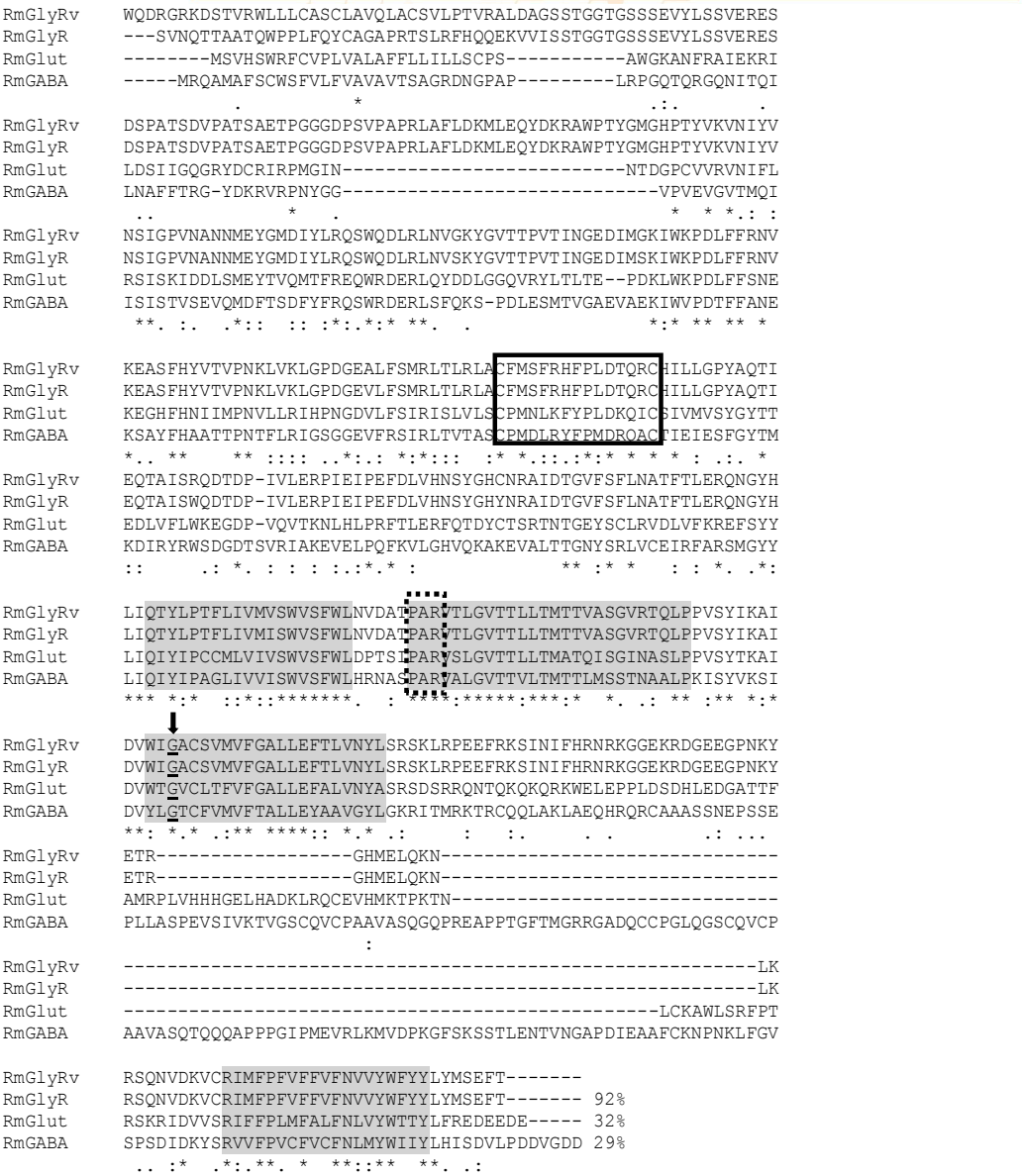


Figura 3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la secuencia deducida de la variante del receptor tipo glicina (*RmGlyRv*), los receptores de GlyR (KJ476181), GluCl (AHE41097) y GABA (AHE41094). Las cisteínas que forman el bucle Cys-loop se resaltan en un cuadro, los pases transmembranales (TM1-TM4) sombreados en gris. El dominio PAR se resalta en un cuadro con líneas punteadas y se indica con una flecha el residuo de glicina en el tercer pase transmembranal.

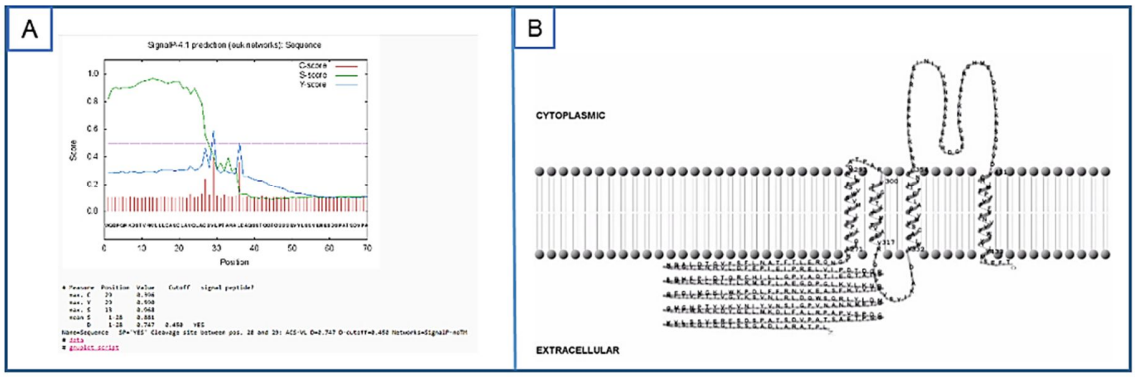


Figura 4. (A) Predicción del péptido señal. (B) Representación en 2D de la variante del receptor tipo glicina de la garrapata *R. microplus*, donde se muestran los dominios extracelulares, transmembranales e intracelular.

Registros electrofisiológicos: Voltage Clamp

Se realizaron registros electrofisiológicos utilizando ovocitos control, microinyectados con agua, ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyR*, ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyRv* y ovocitos microinyectados con una mezcla de ambas variantes.

Se probaron diferentes concentraciones de los agonistas GABA, glicina y glutamato; las concentraciones utilizadas de cada agonista fueron 10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM, 25 mM, 35 mM, 50 mM, 100 mM y 150 mM. De igual manera se probó la combinación de los agonistas previamente mencionados a 1 mM y 50 mM con IVM a una concentración de 10 µM, 50 µM y 100 µM.

No se observaron corrientes en los ovocitos, al aplicar los agonistas GABA y glicina en las concentraciones previamente descritas. Sin embargo, sí se observaron pequeñas corrientes desde la concentración 25 mM del agonista glutamato, tanto en los ovocitos control, como en los ovocitos microinyectados con ARNm de ambas variantes. Se procedió a realizar registros posteriores, empleando la concentración de 50 y 100 mM de glutamato. Se observaron diferencias significativas al comparar las corrientes de los ovocitos control vs los ovocitos microinyectados con ambas variantes y el mix, a una concentración de 50 mM, y sólo en los ovocitos microinyectados con ARNm de la variante *RmGlyRv* a la concentración de 100 mM se observaron diferencias significativas al comparar con el control (Fig. 5).

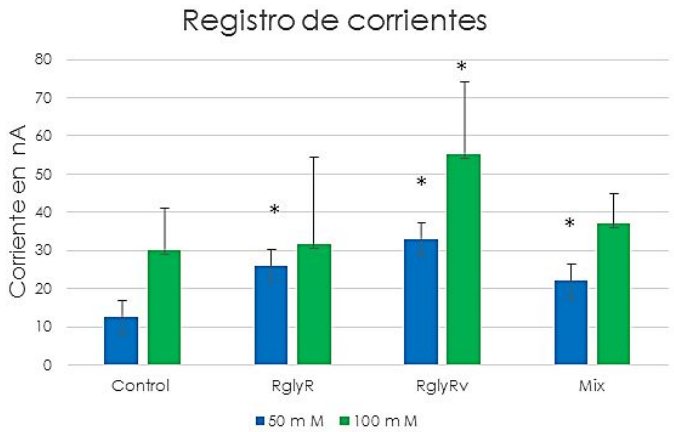


Figura 5. Registro de corrientes en ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Ovocitos control, ovocitos microinyectados con ARNm de la variante *RmGlyR*, con ARNm de la variante *RmGlyRv* y la mezcla de ambas variantes. * Indica significancia estadística.

No se observó incremento de la respuesta al co-aplicar el agonista glutamato con el agonista alostérico IVM. En la figura 6 se muestran ejemplos de las respuestas al aplicar el agonista glutamato en los ovocitos control y en los ovocitos microinyectados con ARNm.

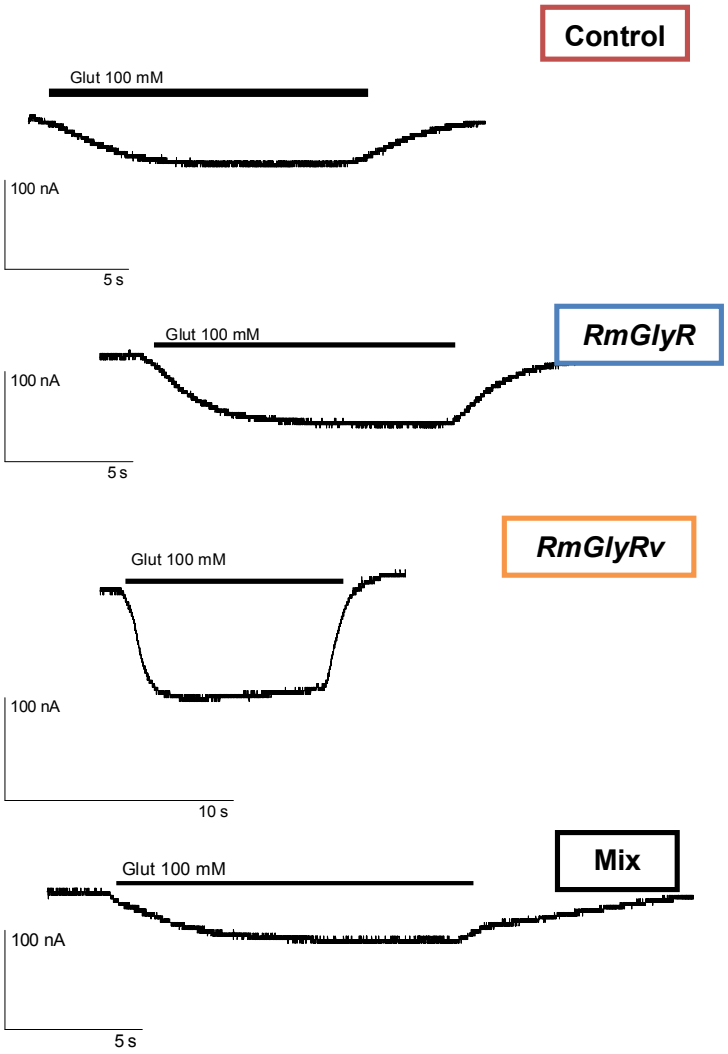


Figura 6. Representación de las cinéticas de los receptores, después de la aplicación de glutamato 100 mM durante 5 y 10 segundos. Las barras sólidas indican la aplicación del glutamato.

Los ensayos electrofisiológicos del presente estudio muestran baja conductancia del receptor en respuesta al agonista glutamato, lo que podría indicar que es probable que el neurotransmisor glutamato esté regulando a este receptor; sin embargo, las concentraciones son muy elevadas y se encuentran fuera del rango normal fisiológico.

El glutamato es un neurotransmisor indispensable, responsable de desencadenar señales post-sinápticas al ser reconocido por los receptores post-sinápticos; en un estudio previo se cuestionó la posición filogenética y los detalles moleculares de cuándo y dónde ocurre el reconocimiento de este agonista en canales de cloro activados por ligando. Los resultados mostraron que para el reconocimiento del glutamato es necesaria la presencia de un residuo de arginina en la base del sitio de unión, que se originó por lo menos tres veces distintas, según los análisis filogenéticos; en la Figura 7 se pueden apreciar los sitios de unión del agonista glutamato [21]. Así mismo, Lynagh y cols [21], a través de mutación dirigida en la secuencia del modelo GluCl (AVR-14B), en los residuos que intervienen en la unión del agonista glutamato (R76, R95, Q141, S169, A197, Y199, Y248 y T245) y que cambios en estos sitios afectan en diferentes magnitudes la afinidad por el agonista.

Los artrópodos como la garrapata pertenecen al superfilo Ecdysozoa, por lo que en el presente estudio se procedió a hacer un análisis de las variantes del receptor tipo glicina, para determinar si existía la presencia de estos sitios de unión al agonista glutamato (Fig. 8).

	G	D	A	E	B	F	C	M2
Dme GluClα	VRS	FREQW	FFSN	YSI	ASYGW	QQKD	TGEYSC	PARVS
Mdo GluClα	VRS	FREQW	FFSN	YSI	ASYGW	QVVK	TGEYSC	PARVS
Cel GLC-1	LRT	LRESW	FFPN	YSV	ASYAY	QLKV	TGIYSC	PARVT
Cel GLC-2	IRM	FREQW	FFPT	YSS	VSYAH	QLKP	TGIYSC	PARVT
Cel GLC-3	IRS	FREEW	FFQN	YSV	ASYAY	QLKK	TGTYSC	PARVT
Hco GLC-5	LRS	FREEW	FFQN	YSC	ASYAY	QIKD	TGAYSC	PARVT
Hco AVR-14B	LRS	FREEW	FFQN	YSV	ASYAY	QQKD	TGEYSC	PARVS
Cel AVR-15	LRS	FRESW	FFQN	YSV	ASYAY	QLKA	TGSYSC	PARVT
Aca GluCl	LLS	LSMTW	YFRN	YSM	QSYTY	THDA	TPKFAC	PARVS
Aca GluC2	VLS	LRQRW	FFRN	YSM	ASYGY	DYQD	TGSFSC	PARIS
Sma GluCl-2	VLA	LRQVW	FFRN	YSQ	GSYGY	ELAE	TGQYTC	PARVP
Sma GluCl-3	IHS	LRQRW	FFRN	FSQ	GSYGY	SMAV	TGRFSC	PARIS
Hco UNC49B	VSS	MRQTW	FFPN	TSQ	ESYCY	SAVV	SGSYRR	PARVG
Dme RDL	VLS	FRQFW	FFVN	RSI	ESFGY	SVGV	TGNYSR	PARVA
Hsa GlyRα1	INS	LRQQW	FFAN	YSI	ESFGY	QVAD	TGKFTC	PARVG

Figura 7. Sitios de unión del agonista glutamato. Alineamiento parcial de la secuencia de aminoácidos de las subunidades GluCl de Ecdisozoos (en color verde), moluscos (en color naranja) y platelmintos (en color rojo). También se muestran dos subunidades GABAAR de Ecdisozoos y una subunidad GlyR de un vertebrado (en color negro). En la imagen, sólo se muestran los bucles de unión a ligando A-G y la parte de la hélice M2. Dme, *Drosophila melanogaster*; Mdo, *Musca domestica*; Cel, *Caenorhabditis elegans*; Hco, *Haemonchus contortus*; Aca, *Aplysia californica*; Sma; *Schistosoma mansoni*; Hsa, *Homo sapiens*. Las flechas indican los residuos de unión al agonista del motivo AAA o los residuos críticos de arginina (color azul, letra resaltada en negrita). (Figura tomada de Lynagh y cols., 2015).

Se realizó un alineamiento de las secuencias de las variantes del receptor tipo glicina, con la secuencia de *GluCl* de *H.contortus* (Modelo AVR-14B) y se pudo observar la presencia de 4 residuos que intervienen en la unión del agonista glutamato en ambas variantes, con algunos cambios en el **Loop G** R118N (RmGlyR) y R121N (RmGlyRv); **Loop A** Q174R (RmGlyR) y Q177R (RmGlyRv); **Loop B** A230G (RmGlyR) y A233G (RmGlyRv); **Loop C** Y277F (RmGlyR) y Y300F (RmGlyRv).

La baja respuesta al agonista glutamato se podría atribuir a la presencia de un cambio en el Loop G de R118N (RmGlyR) y R121N (RmGlyRv), puesto que la arginina en esta posición juega un papel clave en la afinidad del agonista.

Nicke y cols. [22] realizaron un estudio sobre el mecanismo de ensamble del receptor nicotínico de la rata en ovocitos de rana *Xenopus leavis*, encontrando que la subunidad alfa1 se expresaba en diferentes estados de ensamblaje, incluyendo trímeros, tetrámeros, pentámeros y agregados. Sólo las subunidades que lograron formar un homopentámero, adquirieron hidratos de carbono complejos y fueron acarreados hacia la superficie celular. Aquellas que no fueron capaces de formar dicha estructura, fueron retenidas en el retículo endoplásmico, lo que limita la expresión superficial de los receptores. Por esta razón, se sugiere que hay un ensamblaje incompleto de las variantes del canal de cloro modulado por ligando.

Estudios funcionales de receptores Cys-loop provenientes de invertebrados, se han visto limitados por la inhabilidad de ciertas subunidades a expresarse funcionalmente en sistemas heterólogos, como ovocitos de *Xenopus laevis* o líneas celulares. Así mismo, existen reportes en los cuales se observa dependencia directa de la presencia de otras subunidades para la formación de un canal heteromérico, al no tener la subunidad por sí misma, la capacidad de formar un canal homomérico [22], [23].

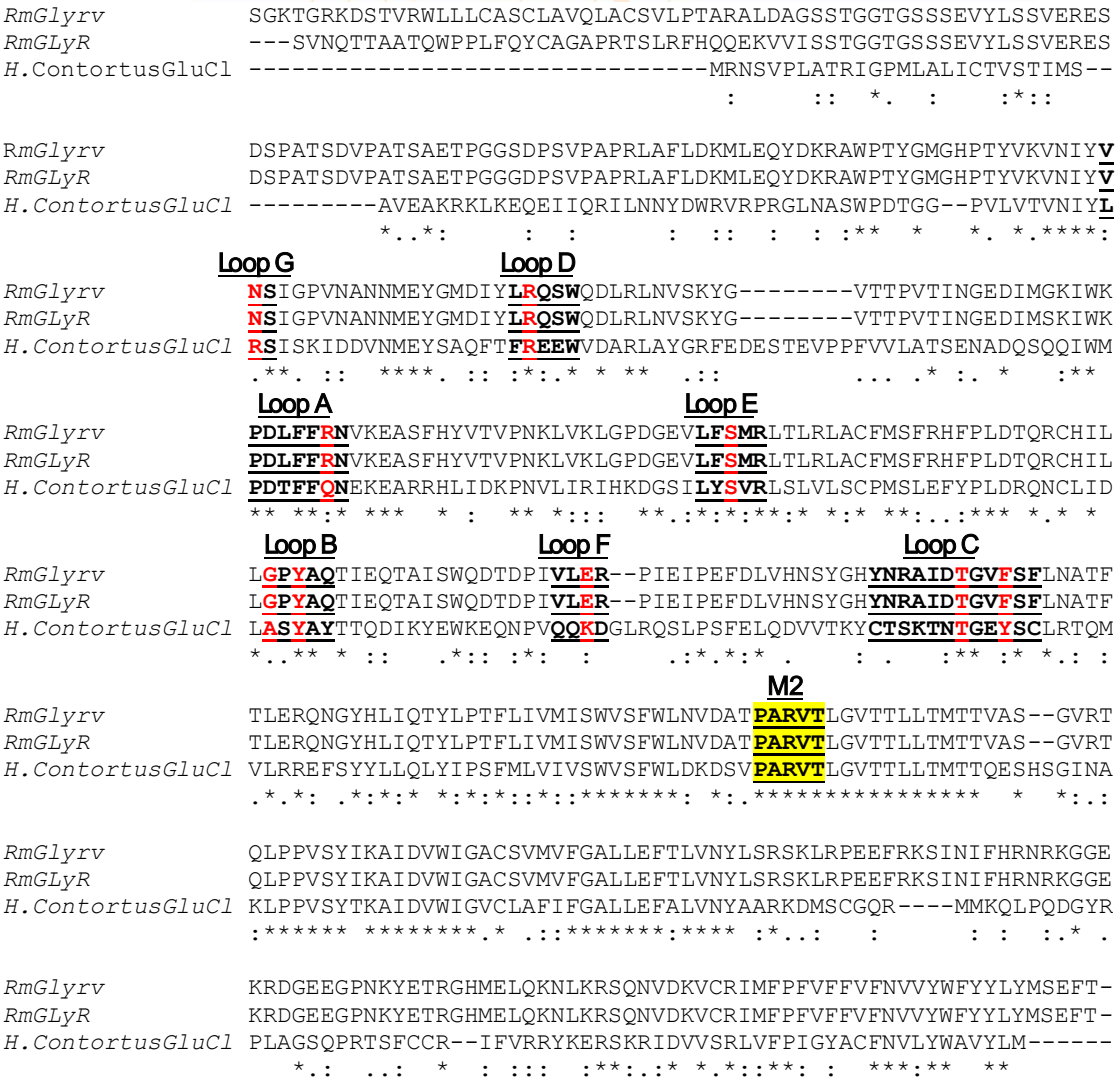


Figura 8. Alineamiento de aminoácidos de las secuencias RmGlyR, RmGlyRv de *R. microplus* y GluCl de *H. contortus* (Modelo AVR-14B). Se resaltan en negritas los bucles de unión a ligando A-G y la parte de la hélice M2, en rojo los residuos que intervienen en la unión del agonista glutamato R76, R95, Q141, S169, A197, Y199, Y248 y T245.

CONCLUSIONES

Nos enfrentamos a grandes limitantes, como el hecho de que el genoma de la garrapata *R. microplus* aún no se encuentra secuenciado, ni caracterizado en su totalidad, y uno de los objetivos de este proyecto es aportar información al conocimiento de la biología de la garrapata.

Como perspectiva directa, es necesario realizar estudios de los complejos proteicos presentes en los ovocitos microinyectados con el canal, puesto que el uso de marcaje y elaboración de geles nativos nos podrían indicar si es capaz de formarse un dímero, trímero, tetrámero o un pentámero con estas

subunidades, así como determinar si son atrapados por el retículo endoplásmico de los ovocitos, lo que limitaría su expresión en la superficie de la membrana.

De igual manera, se requiere la co-expresión de estas variantes del canal de cloro modulado por ligando, en conjunción con los receptores de la familia Cys-loop, presentes en la garrapata *R. microplus* y que ya han sido caracterizados funcionalmente de forma homomérica, para verificar si es necesaria la presencia de otras subunidades para el transporte y ensamble de las mismas, en vías de la formación de un canal funcional.

La obtención de un canal funcional, podría darnos indicios de la posible participación de estas estructuras en el mecanismo de acción de la IVM, así como su asociación a resistencia. Es necesaria la búsqueda de estrategias racionales, para el diseño de agentes acaricidas, a fin de generar agentes más efectivos y con menores posibilidades de desarrollar resistencia.

REFERENCIAS

[1] N. N. Jonsson, "The productivity effects of cattle tick (Boophilus microplus) infestation on cattle, with particular reference to Bos indicus cattle and their crosses.," *Vet. Parasitol.*, vol. 137, no. 1–2, pp. 1–10, Apr. 2006.

[2] M. Martinez-Velazquez *et al.*, "Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from Cuminum cyminum, Pimenta dioica and Ocimum basilicum against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae)," *Parasitol. Res.*, vol. 108, no. 2, pp. 481–487, 2011.

[3] R. Z. Abbas, M. A. Zaman, D. D. Colwell, J. Gilleard, and Z. Iqbal, "Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play," *Veterinary Parasitology*, vol. 203, no. 1–2. Elsevier, pp. 6–20, 2014.

[4] SENASICA, "Situación actual del control de la brucelosis en México | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno | gob.mx," 2017. [Online]. Available: https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp. [Accessed: 19-Sep-2017].

[5] "Garrapata Boophilus spp. | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno | gob.mx." [Online]. Available: https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-el-control-de-la-garrapata-boophilus-spp. [Accessed: 19-Sep-2017].

[6] N. O. Mapholi *et al.*, "Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 5, no. 5, pp. 475–483, 2014.

[7] Z. I. Rajput, S. Hu, W. Chen, A. G. Arijo, and C. Xiao, "Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock.," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 7, no. 11, pp. 912–21, 2006.

[8] A. L. Dourmishev, L. A. Dourmishev, and R. A. Schwartz, "Ivermectin: Pharmacology and application in dermatology," *International Journal of Dermatology*, vol. 44, no. 12. pp. 981–988, 2005.

[9] R. E. Hibbs and E. Gouaux, "Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor.," *Nature*, vol. 474, no. 7349, pp. 54–60, Jun. 2011.

[10] T. Lynagh and J. W. Lynch, "A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors.," *Int. J. Parasitol.*, vol. 40, no. 13, pp. 1477–81, Nov. 2010.

[11] T. Lynagh and J. W. Lynch, "Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 5. pp. 5–11, 2012.

[12] T. Lynagh and J. W. Lynch, "Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 33, no. 8. pp. 432–441, Aug-2012.

[13] E. D. Rivera, "Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos Rhipicephalus microplus," *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, vol. 5, no. 1. 2012.

[14] E. Castro-Janer *et al.*, "Determination of the susceptibility of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay," *Vet. Parasitol.*, vol. 178, no. 1–2, pp. 148–155, 2011.

[15] F. I. C. Mensonides *et al.*, "A new regulatory principle for in vivo biochemistry: pleiotropic low affinity regulation by the adenine nucleotides--illustrated for the glycolytic enzymes of Saccharomyces cerevisiae.," *FEBS Lett.*, vol. 587, no. 17, pp. 2860–7, Sep. 2013.

[16] B. Hille, "Ion Channel Excitable Membranes," *Book*. pp. 1–37, 2001.

[17] H.-G. R. and M.-V. M. Flores-Fernández José Miguel, Gutiérrez-Ortega Abel, Padilla-Camberos Eduardo, Rossario-Cruz Rodrigo, "Molecular cloning and characterization of a glycine-like receptor from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari : Ixodidae)," 2014.

[18] M. Hope, M. Menzies, and D. Kemp, "Identification of a dieldrin resistance-associated mutation in Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae).," *J. Econ. Entomol.*, vol. 103, no. 4, pp. 1355–1359, 2010.

[19] M. Gassel, C. Wolf, S. Noack, H. Williams, and T. Ilg, "The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ-aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity.," *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 45, pp. 111–24, Feb. 2014.

[20] E. C. Mendes, M. C. Mendes, and M. E. Sato, "Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) with larval immersion test," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 61, no. 3, pp. 357–369, 2013.

[21] T. Lynagh *et al.*, "Molecular basis for convergent evolution of glutamate recognition by pentameric ligand-gated ion channels.," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 8558, 2015.

[22] A. Nicke, H. Thurau, S. Sadtler, J. Rettinger, and G. Schmalzing, "Assembly of nicotinic α7 subunits in Xenopus oocytes is partially blocked at the tetramer level," *FEBS Lett.*, vol. 575, no. 1–3, pp. 52–58, Sep. 2004.

[23] G. R. Kim, T.-H. Yoon, W. gyu Park, J.-Y. Park, J. Kang, and H.-W. Kim, "Five nicotinic acetylcholine receptor subunits from the Morotoge shrimp, *Pandalopsis japonica* : cloning, tissue distribution, and functional expression in *Xenopus* oocytes," *Animal Cells Syst. (Seoul).*, vol. 19, no. 6, pp. 393–406, 2015.

[24] A. Nicke, H. Thurau, S. Sadtler, J. Rettinger, and G. Schmalzing, "Assembly of nicotinic α7 subunits in Xenopus oocytes is partially blocked at the tetramer level," *FEBS Lett.*, vol. 575, no. 1–3, pp. 52–58, 2004.

VARIACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE MAÍCES DE HOPELCHÉN, CAMPECHE (MÉXICO).

*Mex-Álvarez, R.M., Garma-Quen, P.M., Bolívar-Fernández, N., Guillén-Morales, M.M. y Pantoja-Bolio, F.M.

Facultad de Ciencias Químico Biológicas de Campeche

*Autor para correspondencia: rafammex@uacam.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

El maíz es la base de la alimentación de México; la diversidad de maíces depende de diversos factores (geográficos, sociales, culturales y climáticos); las variedades de maíces representan una riqueza biológica y cultural que debe caracterizarse para promover su conservación. Por ello, el presente trabajo tuvo por objetivo estudiar la variabilidad genética de granos de maíz nativos que se cultivan en el municipio de Hopelchén, Campeche (México). En total se analizaron 16 maíces; primero se analizaron sus características fisicas y morfológicas por medio de la determinación de humedad, grosor de grano, densidad y el índice de germinación. Luego, para la caracterización genética se hicieron germinar los granos de maíz y se dejaron crecer las plántulas durante cinco días, se tomaron cinco plantas que se procesaron para obtener DNA. Los productos de la extracción se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa de 0.7%, se observó una banda de alto peso molecular definida; para la selección de iniciadores arbitrarios RAPD se probaron 20 iniciadores, se analizó la amplificación por electroforesis en gel de agarosa ultrapura al 1.2%, se seleccionaron los iniciadores que presentaron amplificación y bandas bien definidas, diez iniciadores mostraron los perfiles más polimórficos y se emplearon en la RAPD, en esta prueba se detectaron en promedio 22 bandas (entre 250 y 6000bp). Los resultados del análisis RAPD se analizaron estadísticamente para establecer conglomerados empleando el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de medias aritméticas; la mayoría de los maíces analizados se clasificaron en tres grupos, cada grupo con tres subgrupos, dos variedades de maíces no se clasificaron en alguno de los grupos establecidos; estos resultados indican la diversidad genética del maíz estudiados.

Palabras clave: Desarrollo sustentable; maíz nativo; variabilidad.

REFERENCIAS

[1] Henríquez, P. (2001). Estudio de la Agrodiversidad de Mesoamérica. Aspectos Metodológicos. Red Mesoamericana de Recursos Fitogenéticos. Kravic, N.; Andelkovic, V.; Hadzi-Taskovic-Sukalovic, V.; Vuletic, M. (2009). Antioxidant Activity in seed of Maize Genotypes with Different Percentage of Exotic Germplasm. Genetika. 41 (1): 21-28.

[2] Laynez-Garsaball, J.A.; Méndez-Natera, J.R. (2007). Efectos de los Extractos Acuosos de la Maleza Cyperus rotundus L. (Cyperaceae) sobre la Germinación de Semillas y Crecimiento de Plántulas de Maíz (Zea mays) cv. Pioneer 3031. Rev. Peru Biol. 14 (1): 055-060.

SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA Y CONTROL INTEGRAL DE GARRAPATA *Boophilus spp.* EN EL MUNICIPIO DE TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA.

Guzmán-Vargas, B., Tejeda-Lozano, R., Neri-Muñoz, Ma. Y. y *Hinojoza-Loza, E.

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tlajomulco

*Autor para correspondencia: itajalpp@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Las garrapatas son ectoparásitos obligados que provocan daños no sólo a los animales, si no tambien a la población humana, pués son portadores de enfermedades zoonóticas [1]. En México, el método de control más utilizado es la aplicación de químicos ixodicidas durante la etapa parasitaria; sin embargo, existe evidencia de un comportamiento de resistencia hacia algunos productos [2]. Tlajomulco es un Municipio que a pesar del crecimiento demográfico que ha tenido en los últimos diez años, aún implementa la actividad ganadera; sin embargo las medidas de control de garrapata que tradicionalmente implementan los productores, no han funcionado, pues el parásito es causa de importantes pérdidas económicas, sobre todo en las zonas destinadas para pastoreo [3]. Por lo anterior, se implementó un diagnóstico de la situación epidemiológica de garrapata y un programa de control integral. La garrapata observada en el ganado bovino, fue caracterizada como Boophilus spp y su distribución se situa en zonas de agostadero desde San Juan Evangelista, hasta Buenavista, así como en cerro Balcones, Zapote del Valle, Lomas de Tejeda, Santa Cruz de las Flores y San Sebastian. Entre las medidas de control integral que se implementaron se detectó que los parásitos presentan resistencia al coumafos al 2%, causada por el mal manejo en las dosis y aplicación delproducto, así como la falta de monitoreo del proceso; por lo que al utilizar las aminas para el derribe de garrapata, así como un inhibidor de desarrollo (fluazuron 2.5%) se logró disminuir la garga parasitaria de 200 garrapatas/animal/hato a 02 garrapatas/animal/hato; mientras que en hatos estabulados ya no existe presencia de garrapata.

Palabras clave: Garrapata; distribución geográfica; susceptibilidad; control integral

REFERENCIAS

[1] F. J. Márquez, A. P. Hidalgo, F. C. Contreras, J. L. Rodrpiguez, M. A. Muniain. Las garrapatas como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. Rev. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Vol. 23. No. 2. pp. 94-102, 2005.

[2] A. J. Usabiaga, A. J. Trujillo , M. J. del Valle. Manual de actualización técnico para la aprobación de médicos veterinarios en campañas zoosanitarias para rumiantes. 2004.

[3] E. L. Hinojoza. Situación pecuaria de Tlajomulco de Zúñiga. Reporte técnico, Desarrollo Pecuario, Tlajomulco 2016.

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN BLANCA DE LA CEBOLLA.

*Ceja-Torres, L.F., Torres-Magaña, S.K., y López-Díaz, S.

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR U MICHOACÁN, Justo Sierra # 28, Jiquilpan, Michoacán, México 59510

* Autor para correspondencia: lfceja@ipn.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El cultivo de la cebolla, se encuentra entre las hortalizas más importantes en México. Los estados de Baja California, Guanajuato y Michoacán son los principales productores; en este último se siembra anualmente una superficie de 4,468 ha, que producen 155,108 t, con un rendimiento de 35.5 t/ha^{-1}. Sin embargo, las enfermedades constituyen uno de los factores de mayor riesgo para su producción, siendo la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) la más importante, porque puede provocar pérdidas en rendimiento hasta del 100% sino se controla a tiempo e incluso dejar que los suelos queden estériles. En busca de alternativas para controlar dicha enfermedad, el objetivo del trabajo fue evaluar productos a base de *Trichoderma*, *Glomus* y vermicomposta de gallinaza, aplicados individualmente y combinados. En campo se determinó, la incidencia de la pudrición blanca, la severidad, la densidad de inóculo inicial y final de esclerocios del hongo, y el rendimiento total de cebolla. Al respecto, hubo menor incidencia y severidad en las plantas a las que se les incorporó los tratamientos biológicos (± 50% de incidencia, pero con grado de severidad 1), con respecto al testigo (65.4%); asimismo, la menor producción se obtuvo en los tratamientos más afectados por S. *cepivorum*, (8.7% en el testigo, grado de severidad 2), siendo estadísticamente ($p \leq 0.05$) superior la producción, en los tratamientos biológicos.

PALABRAS CLAVE: *Palabras clave: Allium cepa; Control biológico; Sclerotium cepivorum.*

INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.), se encuentra entre las hortalizas de mayor importancia cultivadas en México, debido a su amplio rango de superficie sembrada, alto consumo y a su alta generación de empleos y divisas. En la actualidad 139 países son los encargados de su producción, pero los principales productores de cebolla son India y China, que juntos cultivan casi la mitad de la producción mundial [1]. México se ubica entre los 17 países con mayor superficie cultivada y de esos 17 le pertenece el lugar número 4° en rendimiento [2]. En México, la cebolla se cultiva en 26 estados, en el año 2012, la superficie nacional cosechada fue de 39,764 ha, de las cuales se obtuvieron 1, 118,804 ton. Los estados de Baja California, Guanajuato y Michoacán son los principales estados productores de este cultivo, de los cuales este último ocupa una superficie de 4,468 ha, una producción de 155,108 ton y un rendimiento de 35.5 t/ha^{-1} [3].

Como cualquier cultivo, la cebolla está expuesta a una gran variedad de plagas y enfermedades, constituyendo uno de los factores de mayor riesgo para la producción de las hortalizas. Cabe señalar

que en los últimos años, las enfermedades fungosas han ocasionado fuertes pérdidas económicas en la producción de diferentes especies hortícolas en México y en el mundo [4]. Una de las enfermedades más importantes con una amplia distribución mundial es la pudrición blanca, causada por *Sclerotium cepivorum*; este hongo solo afecta a las especies de *Allium*, y es capaz de crear una estructura de resistencia en el suelo, la cual puede durar hasta 25 años.

La podredumbre blanca del ajo y la cebolla (*S. cepivorum*) causa pudrición húmeda de las raíces y el bulbo, marchitamiento de la parte aérea y muerte de la planta, si esta no se controla a tiempo puede provocar pérdidas en rendimiento de hasta el 100% e incluso dejar que los suelos queden estériles, por lo cual esta enfermedad es el principal factor limitante para la producción comercial de cultivos del género *Allium*, en aquellas regiones en las cuales una parte significativa del crecimiento del hospedante se produce durante la estación fría [5].

Para controlar a *S. cepivorum* se han utilizado fungicidas que, si bien controlan de alguna manera al fitopatógeno, su impacto negativo es mayor sobre los ecosistemas y la salud humana. Dado lo anterior, es de vital importancia utilizar nuevas estrategias como lo es el control biológico, mismo que es amigable tanto con el medio ambiente, como la salud de las personas y animales superiores. Por lo que el objetivo del trabajo fue evaluar productos a base de *Trichoderma*, *Glomus* y vermicomposta de gallinaza, aplicados individualmente y combinados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del sitio y diseño experimental

El experimento se estableció en una parcela con antecedentes de incidencia de pudrición blanca, en agosto de 2016, en Cojumatlán de Regules, Michoacán, localizado de acuerdo a las coordenadas: Latitud 20°10'30" y Longitud 102°81'63" a una altitud de 1540 msnm. Se trasplantó cebollín de la variedad "Suprema" en un diseño experimental de bloques al azar, en el cual se aplicaron 6 tratamientos con cinco repeticiones. La unidad experimental constó de cinco surcos, cada uno, con una longitud de cuatro metros.

Los tratamientos fueron: 1) vermicomposta de gallinaza, 2) *Glumus* spp., 3) Iprodiona, 4) *Trichoderma harzianum*, 5) Vermicomposta de gallinaza + *Glumus* + T. *harzianum* (Vg+Gl+Th), y 6) Testigo absoluto. Los productos a partir de los cuales se obtuvieron los microorganismos fueron: NatuControl® para el caso de *T. harzianum* y Glumix irrigation® que contiene *Glomus fasciculatum*, *constrictum*, *tortuosum*, *geosporum* e *intraradices*. Las dosis fueron las recomendadas por los fabricantes de los productos. La vermicomposta de gallinaza se aplicó a razón de 20 t. ha^{-1}.

Variables evaluadas

En campo se determinaron las siguientes variables: la incidencia de la pudrición blanca; la severidad (grado 0= plantas sanas, grado 1= plantas con hojas que presentaban un amarillamiento apical y marchitamiento inicial, y grado 2= plantas con 100% de tejido necrótico, bulbos con presencia de micelio blanquecino y esclerocios); la densidad de inóculo inicial y final de esclerocios del hongo, y el rendimiento total de la cebolla.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias obtenidas fueron analizadas por medio de la prueba de comparación de medias de Tukey con una $p<0.05$. Los análisis se llevaron a cabo con el programa SAS System for Windows versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Densidad de inóculo de S. cepivorum

En la parcela experimental se obtuvieron varias submuestras de suelo, que finalmente se mezclaron para obtener una muestra compuesta y determinar la densidad de inóculo inicial de S. *cepivorum*; la cual fue de 1.8 esclerocios/g de suelo. Sin embargo, al final del experimento, la densidad de inóculo fue de 0.3 a 0.5 esclerocios en los tratamientos biológicos y en el tratamiento químico, y de 1.3 esclerocios/g de suelo en el testigo. En consecuencia se puede observar una disminución del inóculo, de alrededor del 80% con respecto al inóculo inicial. Aunque si se compara con el inóculo del testigo, la reducción sería de por lo menos del 60%. Ulacio y col. [6] mencionan que puede deberse a las interacciones químicas y/o biológicas que puedan surgir en el suelo. Otros investigadores [7], comprobaron que *T. harzianum* puede inhibir la germinación de esclerocios debido a una competencia por nutrientes entre ambos microorganismos, o enrollando el micelio del patógeno, para impedir la formación de esclerocios.

El tratamiento químico (iprodiona) tuvo efectos similares a los biológicos. Algunos investigadores [8] evaluaron este producto químico, individualmente y en mezcla con otros, para observar el control sobre la densidad de esclerocios en campo en el cultivo de ajo. Al respecto, encontraron que los productos químicos no redujeron la población del hongo en el suelo, considerando que el número de esclerocios viables, fueron los mismos que el número de esclerocios totales al finalizar el ciclo.

Incidencia y severidad de la pudrición blanca

Las cebollas tratadas con los biológicos y el sustrato orgánico, fueron los que obtuvieron el menor porcentaje de incidencia de pudrición blanca. El tratamiento químico (Iprodiona) no fue tan efectivo como se esperaba, aunque la incidencia de la enfermedad es este tratamiento, fue estadísticamente igual que los biológicos. Se ha documentado que este producto químico funciona solo en periodos cortos del cultivo, principalmente en la siembra de bulbillos, al inicio de la plantación, siempre y cuando se encuentre una baja densidad de esclerocios y en condiciones donde no se favorezca el desarrollo de la enfermedad [9]. El testigo fue el que presentó la mayor incidencia de la enfermedad (65.4%), siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (Figura 1).

Con respecto a la severidad, el testigo fue el más afectado con 8.7% de plantas con grado de severidad 2, plantas que presentaron tejido necrótico, bulbos completamente podridos con presencia de micelio blanquecino y esclerocios. En los biológicos y el sustrato orgánico osciló entre 2.2 y 2.8%, y en el caso del tratamiento químico de 4.5% (grado 2).

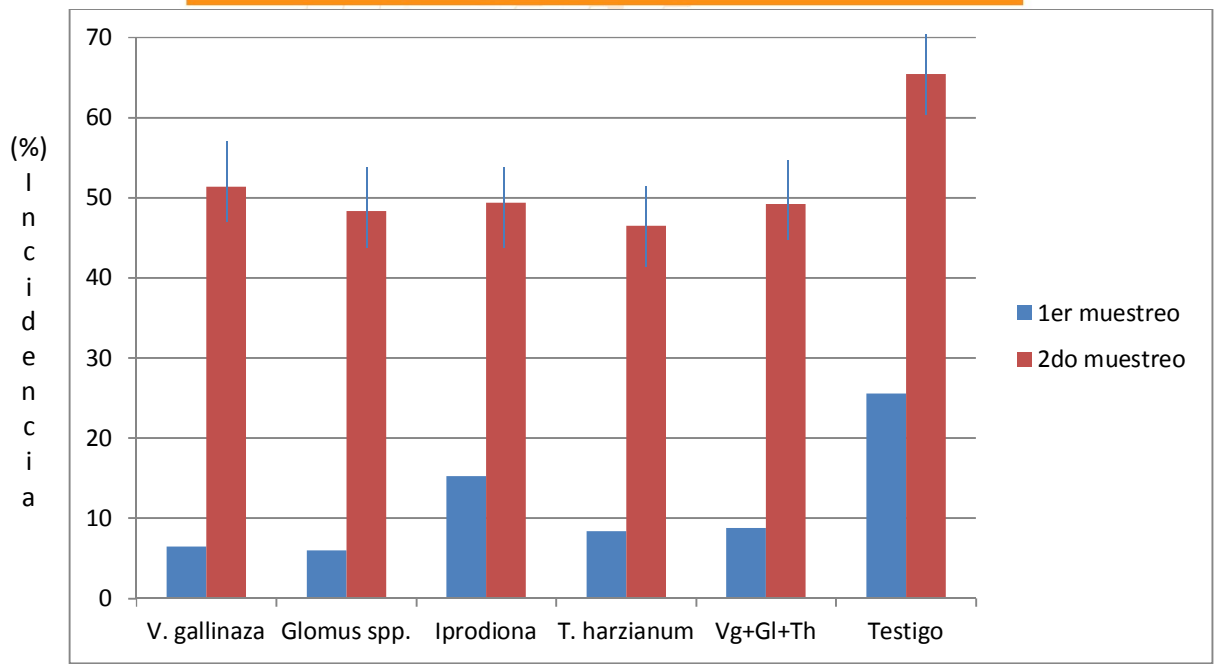


Figura 1. Incidencia de pudrición blanca de la cebolla, dos meses después del trasplante (1er muestreo) y al final del ciclo (2do muestreo).

Producción de cebolla

Los tratamientos en donde se incorporó vermicomposta de gallinaza, *Glomus* spp. y *Trichoderma harzianum* aplicados individualmente, fueron los más productivos; siendo estadísticamente superiores ($p \leq 0.05$), al tratamiento testigo (Cuadro 1). La producción de cebolla al aplicarlos juntos (Vg+Gl+Th), se redujo 17% con respecto al más productivo, aunque resultaron estadísticamente iguales. En este caso la acción combinada no se dio como se esperaba, debido posiblemente a la competencia que pudo existir entre los microorganismos involucrados. Existen varias opiniones sobre la influencia que puede tener *Trichoderma* en el desarrollo de las plantas; por ejemplo, que es capaz de producir un regulador de crecimiento sobre las plantas de diferentes cultivos; asimismo, que secreta alrededor de 70 metabolitos los cuales estimulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas [10]. Con respecto a *Glomus* spp., mucho se ha documentado sobre el incremento en la absorción de nutrientes minerales y la resistencia a condiciones de estrés, cuando establece una simbiosis con las raíces de las plantas, lo que influye positivamente en el crecimiento y desarrollo vegetal [11].

Cuadro 1. Producción promedio de cebolla, por unidad experimental.

Tratamientos	Producción (kg)
1. Vermicomposta de gallinaza	43.788 a
2. *Glumus* spp.	42.813 a
3. Iprodiona	40.228 ab
4. *Trichoderma harzianum*	40.423 a
5. Vermicomposta de gallinaza+*Glumus*+ *T. harzianum*	36.073 ab
6. Testigo absoluto	30.770 b

CONCLUSIONES

Los tratamientos biológicos presentaron buenos resultados en las variables de estudio, con respecto al testigo; pues lograron controlar la densidad de inóculo de S. *cepivorum*, la incidencia y severidad de la pudrición blanca, y aumentar el rendimiento del cultivo de cebolla.

REFERENCIAS

[1] FAO Statistical Database (online). http://faostat.fao.org, 2013.

[2] C. F. J. Osuna y R. S. Ramírez, "Manual para cultivar cebolla con fertirriego y riego por gravedad en el estado de Morelos", SAGARPA. INIFAP. CIRPAS. Campo Experimental Zacatepec. *Libro Técnico No. 12*. 155 p, 2013.

[3] SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera), Bases de Datos SAGARPA-SIAP. México, D.F., 2013.

[4] M. C. Fisher, D. A. Henk, C. J. Briggs, J. S. Brownstein, L. C. Madoff, S. L. McCraw and S. J. Gurr, "Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health", *Nature* 484:186-194. doi:10.1038/nature10947, 2012.

[5] O. D. Ulacio, M. E. Zavaleta, E. R. García, S. F. Delgadillo, S. A. Pedroza y G. A. Martínez, "Materia orgánica y microorganimos antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su Impacto en el progreso de la pudrición blanca en ajo *(Allium sativum* L.*)*", *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, no. 3, pp. 346-354, 2003.

[6] O. Ulacio, Z. Mejía, M. Garza y P. Sandoval, "Strategies for management of *Sclerotium cepivorum* Berk. in garlic", *Journal of Plant Pathology*, vol. 88 no.3, pp. 253-261, 2006.

[7] I. Chet and Y. Henis, "*Trichoderma* as a biocontrol agent against soilborne root pathogens", pp. 110-112. In: C.A. Parker, A.D. Rovira, K.J. Moore, P.T.W. Wog, and J.F. Kollmorgen (eds.), "Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens", *American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota, USA. 358 p, 1985.

[8] M. Granados, "Pudrición blanca de la cebolla: Una enfermedad difícil de combatir", *Agronomía Costarricense*, vol 29, pp. 143-156, 2005.

[9] M. Granados y A. Wang, "Efecto de biocontroladores aislados en fincas productoras de cebolla sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*)", *Agronomía Costarricense,* vol 32 no. 1, pp. 9-17, 2008.

[10] B. Martínez, D. Infante y Y. Reyes, "*Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos", La Habana, Cuba. *Rev. Protección Veg.* vol. 28 no. 1, pp. 1-11, 2013.

[11] Z. Anwar, M. Sayeed y K. Futai, "Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry", (Ed) Anwar, Z.; Sayeed, M. and Futai, K. 365 p, 2008.

MEJORAMIENTO DE LA RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN AXIAL DE UNA MATRIZ GRANULAR DE DIATOMITA PARA ALOJAR NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS MEDIANTE LA ADICIÓN DE CAL.

Bustamante-Espinosa, L.V., Montes-García, P., Vazquez-Feijoo, J.A., Callejas-Hernández, J., Nava-Licona, M.A., y Ortiz-Balderas, M.

Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Ingeniería Civil. Tepatepec, Hidalgo. México.
Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral regional, Unidad Oaxaca, Oaxaca. México.

*Autor para correspondencia: lbustamante@upfim.edu.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN
El manejo integrado de plagas es una alternativa ecológica es el uso de bioplaguicidas. Una formulación económica de los bioplaguicidas es a base de matrices granulares (pellets) que contienen nematodos entomopatógenos (Steinernema glaseri). No obstante, se ha observado la destrucción de matrices granulares (MG) ocasionada por su manipulación y transporte. Por lo anterior, en esta investigación se estudio el efecto de la adición de 6,8 y 10% de cal en la resitencia a la compresión de matrices granulares esféricas que tienen como base tierra diatomita (TD). Además se estimó la energía necesaria para la destrucción de lasMG. Se encontró que la adición del &% de cal incrementa en un 93% la TD, mientras que la adición del 8% de cal incrementa en un 124%. Sin embargo, para el 10% este efecto disminuye con respecto al 8% de cal, pero mejora con respecto a solo TD, Estos resultados muestran que la adición de cal es efectiva para el ncremento de la resistencia a la compresión de MG de TD.

Palabras clave: Bioplaguicida; estabilización de suelos; manejo integrado de plagas; resistencia a la compresión.

REFERENCIAS

[1] Alavéz-Ramírez. R. (2013) Desarrollo de un material compuesto a base de suelo compactado estabilizado con puzolanas. Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Oaxaca. México.
[2] Ansari, M.A., Hussain, M.A., Moens, M. (2009) Formulation and aplication of entomopathogenic nematode-infected cadaavers for control of Hoplian philanthus in turfgrass. Pest Manamegement Science. 65(4) pp 367-374.
[3] ASTM C 1585-04 Standar Test methodos for sampling and testing fly ash or natural pozzolans for use in Porland cement concrete. ASTM International.

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPIDICA DE ESPECIES COMERCIALES Y NATIVAS DE LA FAMILIA TAXONOMICA DE LAS *Rosaceas*, EN MÉXICO.

[1]Aguilera-Arana M.A., [1]Pérez-Espino A.M., [2]Solorio-Alvarado C.R., y [1*]Ortiz-Alvarado, R.

1. Cuerpo Académico de Fisiopatologías-211, Fac. de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Calle Tzintzuntzan No. 173 Col. Matamoros
2. Universidad de Guanajuato, Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato. C.P. 36050. México.

*Autor para correspondencia: rortizalvarado@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La creciente presión demográfica pone énfasis en la capacidad para la producción de alimentos suficientes en volumen y con la capacidad nutrimental. Así existen productos agroalimentarios en los cuales México se ha especializado, como son las especies del genero *Rubus spp*., como las zarzamoras y las frambuesas, las cuales contienen diversos compuestos nutracéuticos. El éxito comercial de estas especies, ha dejado la diversidad biológica de especies nativas como son los capulines (*Prunus serotina var. capulí*) el cual pertenece a la familia de las *Rosaceas* de igual manera que la frambuesa y la zarzamora. Así el presente trabajo se centró en la identificación cualitativa y cuantitativa respecto a la fracción ácidos grasos poliinsaturados contenidos en las semillas de las especies nativas y comerciales de la familia *Rosaceas* estableciendo su calidad nutrimental. Los resultados por barrido espectrofotométrico establecieron que el aceite obtenido de frambuesa (*Rubus idaeus*), zarzamora (*Rubus fruticosus*) y capulin (*P. serotina var. capuli*) presenta el mismo perfil respecto a tres picos que tiene una preponderancia en las longutides de 420 a 800 nanometros. Adicionalmente el análisis por cromatografía de gases estableció la concentración de ácido linoleico 57.8%, Oleico 28.5% y ácido linoleico 7.2%. En su forma *cis*. De esta manera el presente trabajo establece que los miembros más destacados comercialmente y por uso nativo en México (zarzamora, frambuesa y capulin, respectivamente) poseen un perfil de ácidos grasos poliinsaturados los cuales son apreciados por las industrias, farmacéuticas, alimenticias y cosméticas, las cuales no han explorado cabalmente a esta fracción lipídica (proveniente de la semilla) de estas especies comerciales y nativas explotadas en México.

Palabras clave: Nutracéuticos, *Prunus serotina*, Familia *Rosaceas*

INTRODUCCIÓN

La zarzamora (*Rubus fructicosus*) es un fruto preciado a nivel mundial, debido a su contenido de nutrientes con capacidad antioxidante, donde encontramos poli fenoles, flavonoides y ácido ascórbico (Boeing, et al., 2014). Este contenido de nutrientes es uno de los criterios primordiales para su comercialización a nivel mundial donde destaca también el sabor *suis generis* del fruto el cual es industrializado en fresco. México se ubica como uno de los países principales en la producción de los

frutos del genero *Rubus spp.,* y el estado de Michoacán es líder en la producción de este fruto, el cual se comercializa primordialmente en fresco en mercados internacionales. Por lo que el fruto debe cumplir con estándares de aspecto, color y sabor en general, lo cual descarta una cantidad significativa de frutos que no logran posicionarse en la industria en fresco. Esto origina a) pérdidas para la industria productora local del estado de Michoacán, b) desperdicio de alimentos y c) contaminación por residuos sólidos de frutos no comercializados (do Nacimiento et al., 2014). Ante estos problemas se ha explorado la obtención de ácidos grasos con valor comercial a partir de las semillas del fruto de la zarzamora (Bushman, et al., 2004). La obtención y extracción de ácidos grasos, prevenientes de frutos como el aguacate genera una industria ligera de extracción, como sub-producto, de la producción de alimentos en forma masiva (Moreno et al., 2003, Reddy et al., 2012). Éxitos comerciales en el sentido de la producción, comercialización de frutos y generación de industrias ligeras de tipo extractivas de ácidos grasos son: a) producto aguacate (*Persea americana var Hass*), del cual se produce y comercializa el fruto en fresco y derivados comerciales como liofilizados y aceite de aguacate, b) producto aceituna (*Olea europea*), del cual también se produce fruto para su comercialización en diferentes productos donde destaca la obtención de aceite generalmente para uso comestible (Vitaglione, et al., 2013). Cabe mencionar que el desarrollo de economías emergentes a nivel mundial somete a la industria agroalimentaria a una presión de generar productos con estándares de calidad alimenticia y aspectos comerciales, lo cual deja de lado productos alimenticios con valor nutrimental alto, que no cumple los parámetros de comerciales visuales, propiciando el desperdicio de alimentos (Schott et al., 2013). Adicionalmente es necesario poder diversificar el acceso a fuentes alimenticias donde los ácidos grasos de tipo insaturado se encuentran en los aceites extraídos de los frutos aceituna, aguacate y zarzamora (Bushman, et al., 2004; Reddy et al., 2012; Viatagloine, et al., 2013). La obtención de ácidos grasos de tipo insaturado de los frutos anteriormente citados a nivel industrial se realiza a través de métodos extractivos donde se utilizan solventes no polares (Moreno et al., 2003; Reddy et al., 2012), lo que genera que el aceite no tenga la calidad nutrimental requerida y no sea catalogado como aceite virgen, el cual se obtiene a partir del uso de métodos físicos, como pueden por prensado, centrifugación, choque térmico y más recientemente se propone la utilización de microondas y el uso de fluidos en estado supercrítico (Akanda, et al., 2012), donde las tecnologías prescinden del uso de solventes no polares. En el presente trabajo de investigación se describe el método para la obtención de ácidos grasos de cadena insaturada, a través de un método físico (uso de microondas), partiendo de semilla de zarzamora como producto de deshecho sólido de la agroindustria en Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del Material Biológico

Se obtuvieron 3 kilogramos de zarzamoras de la variedad *Tuppi* provenientes de la tenencia de Patúan del Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, de campos de cultivo de la Sociedad Productora Zarzamich. Se transportaron los frutos en cajas con aislamiento térmico, a la Ciudad de Morelia, y se almacenaron a una temperatura promedio de 8°C, toda la noche. Al día siguiente se procesaron los frutos en centrifuga de canasta, por un espacio de 10 minutos a 2000 g, a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80°C.

Sólidos

El residuo sólido se recuperó y se sometió por un espacio de 18 horas a un tratamiento térmico, por luz directa, de una lámpara incandescente de 150 watts de potencia, sobre una superficie de convección, acero grado alimenticio de 3 mm de espesor. Al término se obtuvo un residuo sólido el cual fue

tamizado, liberando las semillas del fruto de zarzamora. Las semillas de zarzamora se sometieron a un molido en mortero, para la extracción por solventes en equipo Soxhlet.

Extracción Soxhlet

Las semillas molidas, en peso seco, se sometieron a extracción por solventes no polares, en equipo Soxhlet, realizando tres extracciones con éter etílico (Meyer, ¿??), y cinco extracciones con pentano, utilizando 3 gramos del material biológico en cada extracción.

Extracción por microondas

Las semillas molidas, en peso seco, se sometieron a un tratamiento térmico por inducción, en horno de microondas bajo el siguiente protocolo: en cada extracción se utilizaron 3 gramos de material molido al cual se le agregó 20 mL de agua bidestilada, y se dejó en reposo por una noche a una temperatura de 8°C, a la mañana siguiente, el vaso de precipitados conteniendo el material molido con el agua se dejó en reposo por un hora una temperatura ambiente y se llevó a cabo el tratamiento en horno de microondas, con una potencia de 0.25-0.33 Kwatts/h. Por un espacio de 20 minutos, obteniendo una temperatura de la mezcla de 88-90°C ±1°C.

Centrifugación

El residuo se colectó y se transfirió a tubos de polipropileno de 1.5 mL de capacidad (Eppendorf) y sometieron a centrifugación por espacio de 15 minutos a 6000 g a una temperatura de 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos limpios de polipropileno de 1.5 mL de capacidad. El sobrenadante de sometió a refrigeración durante 18 horas a una temperatura de 4 a 8°C, los tubos se sometieron a centrifugación a temperatura ambiente por un espacio de 10 minutos y 3000 g. El contenido oleoso se colectó por aspiración con punta con filtro y se guardó en viales de rosca de 2 mL (figura 1).

N

Se realizó un análisis por cromatografía de gases obteniendo el perfil lípido de los ácidos grasos contenidos en el aceite de *R. fruticosus*, (tabla 2), con el aceite de la semilla de *R. fruticosus*, hidrolizado. Adicionalmente se corrió un análisis para observar la abundancia de las especies de C:18 poliinsaturados y la forma en la que se encuentran el aceite *de R. fruticosus*, por resonancia magnética nuclear (ácidos libres o en esteres) (figura 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas de los frutos de zarzamora provenientes de residuos sólidos, son una fuente de ácidos grasos de tipo, C:18 poliinsaturados, como son el ácido linoleico y linolenico, utilizando tratamiento por microondas en cinco diferentes extracciones, se obtiene un rendimiento del 16.83% y una desviación estándar de ±1.58, de cinco extracciones diferentes por éter etílico se obtiene un rendimiento promedio del 15.18 % y ±1.44 de desviación estándar y del 12.40 % con una desviación estándar de ± 1.08 con pentano en cinco extracciones diferentes (ver tabla 1), por lo que el tratamiento por microondas, es una alternativa metodológica para la obtención de ácidos grasos de alto valor comercial, sin la implicación del uso de solventes químicos de tipo no polar, adicionalmente abre la posibilidad de poder obtener ácidos grasos de tipo poliinsaturados de tipo virgen, con el uso de tecnologías emergentes o alternativas, como la aquí mostrada (figura 1).

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento en la extracción de aceite de la semilla de *Rubus fruticosus*.

Tratamiento de extracción	**Microondas**	**Éter etílico**	**Pentano**
Rendimiento Porcentaje en Peso Seco	16.83	15.18%	12.40%
Desviación Estándar	±1.58	±1.44	± 1.08



A) B) C)

Figura 1. Extractos oleosos provenientes de la semilla de zarzamora variedad *Tuppy* (*Rubus fruticosus*). Por tratamiento extractivos por microondas A), éter etílico B) y pentano C).

La propuesta de la nueva tecnología del aceite y pasta de zarzamora está fundamentada en dos efectos de las ondas electromagnéticas sobre el residuo agroalimentario del fruto zarzamora: 1) Rompimiento de membranas y paredes de las células que contienen el aceite. 2) La inactivación de enzimas que catalizan el oscurecimiento y otras reacciones oxidativas. Al ser el aceite transparente a las microondas conservan las propiedades nutraceúticas de estos productos, al no contener restos de solventes químicos (Moreno, et al., 2003, Reddy et al., 2012, Zia et al., 2014). Esto es un efecto específico que se determinó en la aplicación de microondas, que minimiza el deterioro de los nutracéuticos y ácidos grasos esenciales de la semilla de zarzamora, obteniendo dos productos: el aceite extra virgen y una pasta reducida en calorías que puede utilizarse para composteo (Schott, et al., 2013). De esta forma, esta tecnología tiene tres ventajas: 1) Es menos contaminante al utilizar la pasta de alta calidad y no emplear disolventes orgánicos o soluciones acuosas que producen aguas residuales y 2) Conserva las propiedades nutracéuticas de la zarzamora en productos de alta calidad, como son los ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolenico (tabla 2 y figura 2, (Reddy et al., 2012) y 3) como se puede observar el uso de microondas y centrifugación permite obtener un rendimiento superior a los métodos de extracción por solventes orgánicos, como se aprecia y se compara respecto al porcentaje de aceite obtenido por el método por microondas respecto a los otros métodos químicos observado en la tabla 1.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases del aceite de la semilla de *Rubus fruticosus*, extracción por microondas.

Entrada	Ácido Graso	TR (min)	%
1	Linoleico (C18:2n6c)	33.428	57.94
2	Cis-oleico (C18:1n9c)	31.413	23.71
3	Linolenico (C18:3n3)	35.643	7.73
4	Palmitico (C16:0)	26.410	5.15
5	Esteárico (C18:0)	29.995	3.04
6	Araquidonico (C20:0)	33.636	1.23
7	Cis-11-Eicosenoico (C20:1)	35.061	0.58
8	Miristico (C14:0)	22.727	0.22
9	Behenico (C22:0)	37.456	0.14
10	Palmitoleico (C16:1)	27.812	0.10
11	Laurico (C12:0)	19.507	0.07
12	Heptadecanoico (C17:0)	28.149	0.07

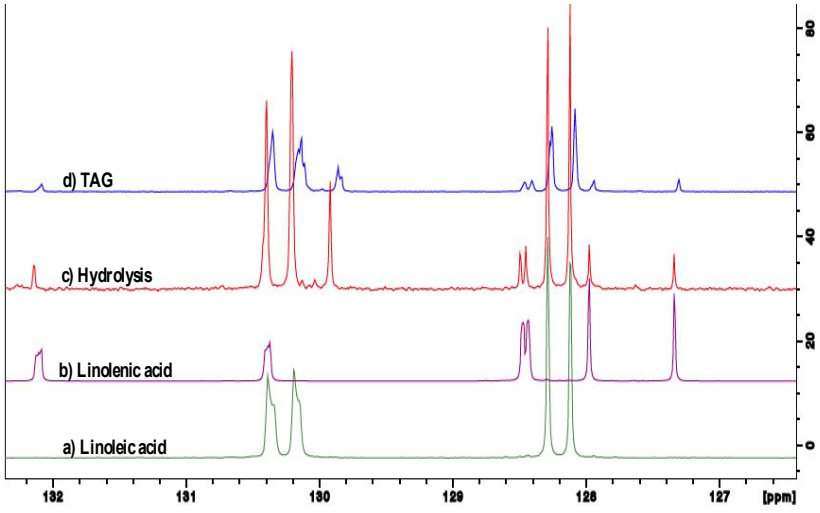


Figura 2. Resonancia magnética nuclear de las especies de ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios en el aceite de *R. fruticosus*, a) ácido linoleico, b) ácido linolenico, c) aceite hidrolisado y d) aceite sin hidrolizar en forma de triacil-gliceroles (TAG).

El proceso es flexible al poder ser aplicado en un esquema por lotes, en una planta modular, en procesos continuos. Incluye la posibilidad de darle al producto las características tales para obtener una pasta congelada o deshidratada. Los nutracéuticos tales como la vitamina E, fitoesterol, luteína y clorofilas son sustancias benéficas para la salud, que se encuentran solubles en el aceite extra virgen de aguacate obtenido por la tecnología objeto de esta invención, lo que hace al producto rico en estos ácidos grasos poliinsaturados, en comparación con los aceites existentes en el mercado. En el presente trabajo, se presenta un mapa de ruta crítico referente a la utilización de la semilla de zarzamora, proveniente de los residuos sólidos generados, en la agroindustria de este sistema producto, para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (tabla 2 y figura 2) de alto valor comercial, por medio de tecnologías alternativas, comparando con los sistemas tradicionales de extracción química, se platea un uso a los deshechos solidos agroindustriales.

CONCLUSIONES

En este trabajo se concluye que la semilla del fruto *Rubus fruticosus* es una materia prima de importancia nutrimental mayor para la obtención potencial de ácidos grasos poliinsaturados de tipo C:18 lo que podría dar una alternativa de comercialización a los productores de este sistema producto de la zarzamora y el uso de tecnologías alternativas extractivas como las microondas, permite poder acrecentar los métodos de extracción de ácidos grasos con valor comercial como los ácidos grasos poliinsaturados.

AGRADECIMIENTOS

CAEC-211-UMNSH, PROYECTO FINANCIADO POR LA CIC DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, CONVOCATORIA, AÑO 2017.

REFERENCIAS

[1] Akanda M.J., Sarker M.Z., Ferdosh S., Manap M.Y., Ab Rahman N.N., Ab Kadir M.O. (2012). Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources. *Molecules*. 10;17 (2):1764-94.

[2] Boeing J.S., Barizão E.O., Silva B.C., Montanher P.F., de Cinque Almeida V., [3] Visentainer J.V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem. Cent J.* 22;8(1):48.

[3] Bushman B.S., Phillips B., Isbell T. (2004). Chemical composition of caneberry (Rubus spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *J Agric Food Chem*. 52(26):7982-7.

[4] do Nascimento Nunes MC, Nicometo M, Emond JP, Melis RB, Uysal I. (2014). Improvement in fresh fruit and vegetable logistics quality: berry logistics field studies. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci*. 5; 372(2017):20130307.

[5] Hassimotto N.M., Pinto Mda. S., Lajolo F.M. (2008). Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (Rubus fruticosus L.) juices with and without defatted milk. J Agric. Food Chem. 56(24):11727-33. Matthäus B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J. Agric. Food Chem. 50(12):3444-52.

[6] Moreno A.O., Dorantes L., Galíndez J., Guzmán R.I. (2003). Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana Mill.*) oil. J. *Agric. Food Chem*. 51(8):2216-21.

[7] Reddy M., Moodley R., Jonnalagadda S.B. (2012). Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana Mill*.) oil--effect of extraction methods. *J Environ. Sci. Health. B.* 47(6):529-37.

[8] Schott A.B., Vukicevic S., Bohn I., Andersson T. (2013). Potentials for food waste minimization and effects on potential biogas production through anaerobic digestion. *Waste Manag Res*. 31(8):811-9.

[9] Vitaglione P., Savarese M., Paduano A., Scalfi L., Fogliano V., Sacchi R. (2013). Healthy virgin olive oil: a matter of bitterness. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 54(8):2216-21.

[10] Zia-Ul-Haq M., Riaz M., De Feo V., Jaafar H.Z ., Moga M. (2014). *Rubus fruticosus L.*: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*.19(8):10998-1

EVALUACIÓN DE COLOR Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN MAÍCES (*Zea mays* L.) PIGMENTADOS AUTÓCTONOS DEL SUR DE NUEVO LEÓN.

[1]Rodríguez-Salinas, P.A., [1]Zavala-García, F., [2]Urías-Orona, V., [3]Muy-Rangel, D., [3]Basilio-Heredia, J., [1]Rodríguez-Romero, B.A. y [1*]Niño-Medina, G.

1. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco Villa S/N, Col. Ex Hacienda El Canadá, Escobedo, Nuevo León. C.P. 66050.

2. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facutad de Salud Pública y Nutrición, Av. Dr. Eduardo Aguirre Pequeño y Yuridia, Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León. C.P. 64460.

3. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán. Carretera El dorado km 5.5, Col. Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa. C.P. 80110.

*Autor para correspondencia: guillermo.ninomd@uanl.edu.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El cultivo del maíz (*Zea mays L.)* es uno de los más importantes del mundo y México centro de origen de este cultivo, presenta la mayor diversidad genética con más de 59 razas criollas. Debido a esto, es preciso mantener su diversidad genética y características de distinción [1,2]. Por tanto, se evaluaron 15 genotipos de maíces autóctonos del sur de Nuevo León, obtenidos de las diferentes localidades del municipio de Aramberri, N.L., para determinar el color del grano y harina se utilizó un colorímetro (CR-400, Konica Minolta, Japan) basado en escala Cielab obteniéndose los valores de luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h°). El contenido de antocianinas totales (AT), compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides (FL) y taninos condensados (TC), así como para capacidad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS y FRAP en extractos solubles y ligados fue medido con un espectrofotómetro (SP-830 Plus, Barnstead, Turner, USA). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de un factor con una comparación de medias por Tukey (P≤0.05). El color del grano varió en h°, por lo que se observaron 3 grupo de colores rosa (352.90-359.19), rojo (14.36-38.35) y naranja (45.24-85.71), y en harina 2 grupos rojo (19.63-40.73) y naranja (46.90-87.05), los mayores valores de L* y C* se mostraron en los maíces amarillo (85.45, 32.10) y blanco (88.78, 12.41). El contenido promedio de AT fue 33.12 mg ECG/100g, CFT 119.37 y 304.31 mg EAG/100g, TC 68.46 y FL 26.15 y 35.00 mg EC/100g en extractos solubles y ligados. La capacidad antioxidante promedio por DPPH 608.60 y 885.60, ABTS 8803.40 y 2907.75, FRAP 3.61 y 6.77 µmolET/100g en extractos solubles y ligados. El contenido de AT mostró correlación significativa, entre los valores de L* (r2=-0.75) y h° (r2=-0.78) del color de la harina, entre los extractos solubles de TC (r2=0.91) y FL (r2=0.82), así como entre capacidad antioxidante ABTS (r2=0.80) y FRAP (r2=0.86). Los valores de AT fueron más altos en los maíces morados y menores en amarillo y blanco. Los CFT presentaron los valores más altos en los extractos ligados, los TC no fueron identificados en los extractos ligados, los FL también obtuvieron una alta concentración en extractos ligados, así mismo en los extractos ligados fueron mejores en capacidad antioxidante.

Palabras clave: *Zea mays* L.; grano; harina; fenólicos solubles; fenolicos ligados.

REFERENCIAS

[1] A. Turrent-Fernández, T. A. Wise, E. Garvey. Factibilidad de alcanzar el potencial productivo de maíz de México. Mexican Rural Development Research Reports. Reporte 24, pp. 1-36. 2012.

[2] R. Fernández-Suárez, L. A. Morales-Chávez, A. Gálvez-Mariscal. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. Rev. Fitotec. Mex. 36, S3-A, pp. 275-283. 2013.

LOS ACTINOMICETOS: UNA ALTERNATIVA PARA EL MANEJO SUSTENTABLE DE HONGOS PATÓGENOS DE LOS CÍTRICOS (*Citrus sp*.)

*Polanco-Florián, L.G., Pérez-González, O. y Alvarado-Gómez, O.G.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco Villa s/n, Col. Ex−Hacienda El Canadá, C.P. 66050, Escobedo, Nuevo León, México

*Autor para correspondencia: polancolaura7@gmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

El cultivo de cítricos es afectado por hongos patógenos que reducen su producción y provocan la muerte de árboles. Su control por lo general, se basa en el uso de fungicidas sintéticos, cuyos efectos colaterales pueden ocasionar la resistencia de plagas y enfermedades, la reducción de microorganismos benéficos entre otros. Una alternativa es el uso de agentes antagónicos, los cuales pueden regular el desarrollo y propagación de los patógenos mediante diversos mecanismos, y al mismo tiempo contribuyen con el manejo sustentable. Entre los microorganismos utilizados como biocontrol se encuentran los actinomicetos, los cuales poseen la capacidad de producir una gran cantidad de compuestos como antibióticos y antifúngicos. Con el objetivo de probar cepas de actinomicetos contra hongos fitopatógenos de los cítricos fueron aislados actinomicetos de suelo y se evaluó su capacidad antagónica frente a los fitopatógenos Lasiodiplodia theobromae, Phomopsis sp. y Alternaria sp. Los resultados reflejan que el mayor porcentaje de inhibición lo presentó la cepa ACT1 frente al hongo L. theobromae, con un 56% de inhibición y la cepa ACT2 causó una inhibición de 48%. Asimismo la cepa ACT1 inhibió el crecimiento de Phomopsis sp. en 52%, y la cepa ACT2 con 49%. La cepa ACT1 mantuvo su capacidad inhibitoria por más de 20 días. El grado en que las cepas de actinomicetos pudieron reducir el crecimiento de los hongos estudiados y el tiempo en el que los pudieron mantener inhibidos, presentan una alternativa de control para resolver los problemas sanitarios que causan los fitopatógenos al cultivo de cítricos.

Palabras clave: biocontrol; inhibición; fitopatógenos; Lasiodiplodia

FENOLOGIA Y PRODUCCIÓN DE 4 HÍBRIDOS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*) EN TEMPORAL DEFICIENTE.

[1*]Sánchez-Sánchez, E., [1]Armenta-Castro, C.M., [1]Armenta-Cejudo, R.A.

1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Norman E. Borlaug-Sitio Experimental Valle del Mayo, Km. 9 Carretera Navojoa-Huatabampo, Navojoa, Sonora, México 85800

*Autor para correspondencia: sanchez.ernesto@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

La Higuerilla (*Ricinus communis*) es una oleaginosa que tiene gran capacidad de adaptación y hoy en día es cultivada prácticamente en todas las regiones tropicales y subtropicales, aunque es típica de regiones semiáridas. Sin embargo, es importante identificar materiales de esta especie que estén plenamente adaptadas a las regiones donde se piensa establecer como cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar 4 híbridos de higuerilla bajo condiciones de temporal en el sur de Sonora. Este trabajo se realizó en la localidad de El Tezal, municipio de Álamos, Sonora, ubicado geográficamente en las coordenadas 27°02´50´´ latitud Norte y 108°58´18´´ longitud Oeste, que presenta un suelo de textura franco-arenosa. Los tratamientos evaluados fueron los 4 híbridos de higuerilla: CF-E, CF-G, CF-L y CF-Z. Se observó en esta parcela una precipitación pluvial total de 159 mm, desde la siembra, 26 de julio del 2016, hasta cosecha, lo cual se consideró como temporal deficiente para esta región. El híbrido CF-G fue el material que tuvo un comportamiento fenológico precoz y fue el más productivo, superando estadísticamente al resto de los híbridos, bajo las condiciones ambientales del sur de Sonora.

Palabras clave: *Ricinus communis*; híbridos; temporal; fenología; producción.

REFERENCIAS

[1] Mejía, S. I. 2000. Generalidades. La higuerilla. www.unalmed.edu.co/.../HIGUERILLA.htm. Fecha de consulta 13/05/2015.

[2] Ugolini, J. 2000. Biodiesel. Estudio para determinar la factibilidad técnica y económica del desarrollo del biodiesel. Santa Fé, Argentina. 25 p.

COMPORTAMIENTO DE LA HIGUERILLA (*Ricinus communis*) A DIFERENTES DENSIDADES DE POBLACIÓN EN TEMPORAL.

[1*]Sánchez-Sánchez, E., [1]Armenta-Castro, C.M., [1]Armenta-Cejudo, R.A.

1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Norman E. Borlaug-Sitio Experimental Valle del Mayo, Km. 9 Carretera Navojoa-Huatabampo, Navojoa, Sonora, México 85800.

*Autor para correspondencia: sanchez.ernesto@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El cultivo de higuerilla se ha extendido en el mundo y su aceite es el único en la naturaleza que es soluble en alcohol, el más denso y viscoso de todos, por eso, tiene un amplio mercado por los múltiples usos en diversas industrias. En el estado de Sonora, a la planta de higuerilla (*Ricinus communis*) se le tiene catalogada como una maleza la cual se encuentra ampliamente distribuida. Sin embargo, es importante validar y adecuar la tecnología de producción de esta especie como cultivo, bajo las condiciones de temporal del sur de Sonora. El objetivo de este estudio fue evaluar 5 densidades de población de plantas de higuerilla bajo las condiciones de temporal del sur de Sonora. Este trabajo se realizó en la localidad de El Tezal, Álamos, Sonora, ubicado en las coordenadas 27°02´50´´ latitud Norte y 108°58´18´´ longitud Oeste. Los tratamientos evaluados fueron 5 densidades de población del híbrido de higuerilla CF-G: 53,333 plantas/ha, 26,666 plantas/ha, 17,777 plantas /ha), 13,333 plantas/ha, 13,333 plantas /ha. La precipitación pluvial total fue 159 mm durante el ciclo del cultivo. La densidad de plantación influyó en el comportamiento fenológico del cultivo de higuerilla bajo condiciones de temporal del sur de Sonora. La densidad de 17,777 plantas por hectárea, fue la más productiva bajo las condiciones de temporal del sur de Sonora.

Palabras clave: *Ricinus communis*; híbridos; temporal; fenología; producción.

REFERENCIAS

[1] Mejía, S. I. 2000. Generalidades. La higuerilla. www.unalmed.edu.co/.../HIGUERILLA.htm. Fecha de consulta 13/05/2015

[2] Rico, P. H.R.; Tapia V. L.M.; Teniente O.R.; González A. A.; Hernández M. M.; Solís B. J.L. y Zamarripa C. A. 2011. Guía para cultivar higuerilla (Ricinus communis L.) en Michoacán. SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Valle de Apatzingán, Michoacán. Mayo. Folleto Técnico No. 1: 24-25.

COMPONENTES DE RENDIMIENTO Y CALIDAD DE FRUTO DE HÍBRIDOS DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot.).

[1*]Ramírez-Godina F., [2]Robledo-Torres, V., [1]Torres-Tapia, M.A., [1]García-Osuna, H.T.

1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro #1923 Buenavista Saltillo Coahuila México 25315
2. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Calzada Antonio Narro #1923 Buenavista Saltillo Coahuila México 25315

*Autor para correspondencia: godramf@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El objetivo fue estudiar componentes de rendimiento (CDR), calidad de fruto y estimar heterobeltiosis en híbridos de tomate de cáscara. Se utilizaron siete progenitores y 29 híbridos bajo un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Se evaluó: peso total de fruto (RTF), peso promedio de fruto (PPF), número de frutos por planta (NFP), diámetro ecuatorial (DEF) y polar de fruto (DPF), firmeza de fruto (FF), sólidos solubles totales (SST) y Vitamina C (VC). En RTF, PPF, NFP, DPF, DEF, SST y VC, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre genotipos, indicando amplia variabilidad genética entre progenitores y sus híbridos, el 3x4 presentó el mayor RTF (1165.1gr por planta) con una heterobeltiosis del 25.10%, superando en más del 221% a la Variedad Rendidora, se encontró que los híbridos con mayores valores de heterobeltiosis en RTF y CDR, fueron; las cruzas 1x3, 1x6, 2x1 y 5x1. En calidad de fruto, el 3x1 presentó el valor más alto con 6.57 ºBrix, en vitamina C el híbrido 7x4 tuvo 4.99 mg/100g, que representa 23% más vitamina C que la Variedad Rendidora. Cinco híbridos, presentaron amplia variabilidad en CDR y calidad de fruto, identificando las mejores cruzas para su explotación a nivel comercial.

Palabras clave: Heterosis; Heterobeltiosis; mejoramiento genético; cruzas.

INTRODUCCIÓN

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) también conocido como tomate verde o tomate de fresadilla, es una de las hortalizas de importancia mundial, ya que el fruto fresco se utiliza en la preparación de salsas y un gran número de platillos regionales [1]. Es una especie nativa de México y Centroamérica y uno de los cultivos hortícolas más importantes. Actualmente ocupa el quinto lugar en superficie sembrada, con 42,639 Ha, con un rendimiento promedio de 16,705 $t \cdot ha^{-1}$. Se cultiva en 29 de los 32 Estados de la República Mexicana, de los cuales los principales estados productores son: Sinaloa, Jalisco, Puebla, Nayarit y Zacatecas [2].

Se considera que el rendimiento es bajo en relación al potencial productivo del cultivo, que se estima en 40 $t \cdot ha^{-1}$, una de las causas del bajo rendimiento es el uso de variedades de bajo potencial productivo, ineficiencia en las técnicas de producción, siembra de semillas de mala calidad y un control ineficiente de plagas y enfermedades [3]. La hibridación representa algunos problemas, debido a la

autoincompatibilidad, aunque es posible obtener híbridos sobresalientes mediante la cruza de progenitores derivados de las variedades Puebla y Rendidora, entre estas razas se ha encontrado la mayor heterosis y se han obtenido híbridos planta a planta que superan al mejor progenitor [4], [5].

Ante la demanda creciente del fruto de tomate de cáscara y del aumento de la superficie cultivada de esta hortaliza se hace necesario el mejoramiento genético, a través de la obtención de variedades mejoradas, un camino viable y relativamente barato para lograr incrementos en la productividad. Debido a la importancia que ha cobrado el cultivo de esta especie en México, es necesario buscar a través del mejoramiento genético, el desarrollo de variedades de alto potencial productivo, ya que esto permitirá al productor tener mayores beneficios económicos y además tener producto de alta calidad [6]. Por lo tanto se plantearon los siguientes objetivos: Identificar genotipos de alto rendimiento y calidad de fruto, que puedan satisfacer las necesidades del mercado. Estimar la heterobeltiosis de los híbridos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento en campo

El experimento se llevó a cabo en el 2016 en el campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo Coahuila. El material vegetal utilizado consistió de 7 progenitores (Coloso, *P. angulata*, Palmarito, G. Esmeralda, M. Tamazula, Rendidora, Sel.-133-05) de diverso origen y 29 híbridos resultantes de cruzas directas y reciprocas que fueron sembradas depositando de dos a tres semillas por cavidad, en charolas de poliestireno de 200 cavidades, utilizando como sustrato turba y perlita en una proporción de 1:1, cuando las plántulas alcanzaron de 10 a 12cm de altura y dos pares de hojas verdaderas, fueron trasplantadas en camas elevadas de 25 cm, con acolchado plástico de color negro, con riego por goteo, a una distancia de 1.60 metros entre camas, trasplante a doble hilera en forma de tresbolillo y 60 cm entre plantas. Cada parcela experimental fue constituida por 12 plantas y como parcela útil 8 plantas con competencia completa. Los tratamientos se establecieron bajo un diseño experimental de bloques al azar, con tres repeticiones. La fertilización (180-120-240 kg.ha-1) se realizó por medio de fertirriego, aplicándose una vez por semana a lo largo del ciclo de cultivo.

Componentes del rendimiento de híbridos y progenitores

Para la evaluación de los componentes del rendimiento en híbridos y progenitores, se estimaron las siguientes variables: Peso total de fruto (RTF), se determinó al momento de cosecha pesando en una báscula digital, todos los frutos producidos por planta, estimado de una muestra aleatoria de 8 plantas en cada una de las tres repeticiones, considerando la suma de cuatro cortes con intervalos de 15 días, se obtuvo el rendimiento total en g/planta.

Peso promedio de fruto (PPF), se estimó del rendimiento total de frutos en gramos dividido entre el número total de frutos por planta, expresado en gramos, considerando los cuatro cortes. Número de frutos por planta (NFP), después de pesar se contó el número de frutos por planta, de las mismas 8 plantas en cada una de las repeticiones, terminada la cosecha se estimó el promedio de frutos totales por planta. Diámetro polar de fruto (DPF) y Diámetro ecuatorial de fruto (DEF), para estas variables se tomaron cuatro frutos al azar de cada una de las 8 plantas, en cada una de las tres repeticiones, se midió la distancia entre cada polo del fruto y la distancia tomada de la parte ecuatorial del fruto, con un vernier digital de precisión (Autotec®).

Calidad de fruto de híbridos y progenitores

Firmeza de Fruto (FF), se determinó con un penetrómetro (Frut Presure Tester), para esto se retiró la cutícula de cada fruto en dos puntos opuestos de la parte del ecuador del fruto, se introdujo la puntilla de un solo impulso para medir la fuerza necesaria para penetrar 1 cm del tejido de la pulpa del fruto de tomate, se tomaron dos lecturas por fruto y se reportaron en (Kg/cm^2). Sólidos Solubles Totales (SST), se tomaron cuatro frutos de cada muestra, los cuales se molieron y se colocó una gota de jugo de tomate de cáscara en el prisma del refractómetro marca Atago N-1E® y el resultado se expresa en °Brix. Vitamina C (VC), se determinó de acuerdo a la metodología oficial de la [7], método de titulación con 2,6 Dicloroindofenol-reactivo de Tihelmann. Expresado en miligramos de vitamina C por 100 gramos de peso fresco de fruto (mg $100g^{-1}$).

Estimación de Heterobeltiosis

Para la estimación de la Heterobeltiosis, de las características de rendimiento y calidad de fruto bajo estudio se utilizó la siguiente fórmula: H – MP/MPX100; donde H=híbrido, MP=mejor progenitor.

Análisis Estadístico

Con los valores medios de las variables, se realizaron análisis de varianza y para la comparación de medias se aplicó Tukey (P≤0.05), mediante el programa estadístico SAS versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Componentes del rendimiento de híbridos y progenitores

Los análisis de varianza indican diferencias significativas (P ≤ 0.01) entre genotipos en las medias de las variables estudiadas indicando la amplia variabilidad presente entre progenitores y los híbridos bajo estudio.

La comparación de medias muestra que el progenitor Gran esmeralda presentó el mayor rendimiento con 931.3 gr y de fruto por planta y el progenitor rendidora presentó el más bajo, los híbridos 3x4 y 4x3 (1165.1 y 1071.7g/planta) presentaron los mayores rendimientos de fruto, superando en 25 y 15 % al mejor progenitor Gran Esmeralda (Figura 1). En la variable de PPF el progenitor Gran esmeralda presentó el mayor valor, sin embargo los híbridos 4x1 y 3x4, superaron en PPF en un 28 y 25% al mejor progenitor respectivamente, [8] indican que el PPF es una variable importante porque está estrechamente relacionada con la producción total por planta.

En NFP se encontraron diferencias estadísticas significativas (P<0.05) entre genotipos. El progenitor Morado Tamazula fue el que presentó el mayor NFP (34.32 frutos/planta) y fue estadísticamente igual (P>0.05) a los híbrido 4x5, 4x3 y 7x6, aunque lo superaron en 6, 4 y 3 respectivamente (Figura 1). [9] mencionan que existe una correlación positiva entre número de frutos y rendimiento total en tomate de cáscara. De igual forma se encontró que el mayor NFP lo presentaron las cruzas que tuvieron los más altos rendimientos. En las variables DPF y DEF, el progenitor Gran Esmeralda fue el que presentó los mayores valores y fue igual al progenitor Palmarito, sin embargo hubo híbridos como el 3x4, 4x1, 4x3 que presentaron un DPF mayor aunque estadísticamente igual a los progenitores Gran Esmeralda y Palmarito. En DEF los híbridos 3x4, 4x3, 4x1 y 2x1 presentaron un diámetro superior a 5 cm superando al Gran Esmeralda en 7%, 5%, 4% y 2%, respectivamente, aunque estadísticamente (P≤0.05) fueron iguales a los mejores progenitores en DEF.

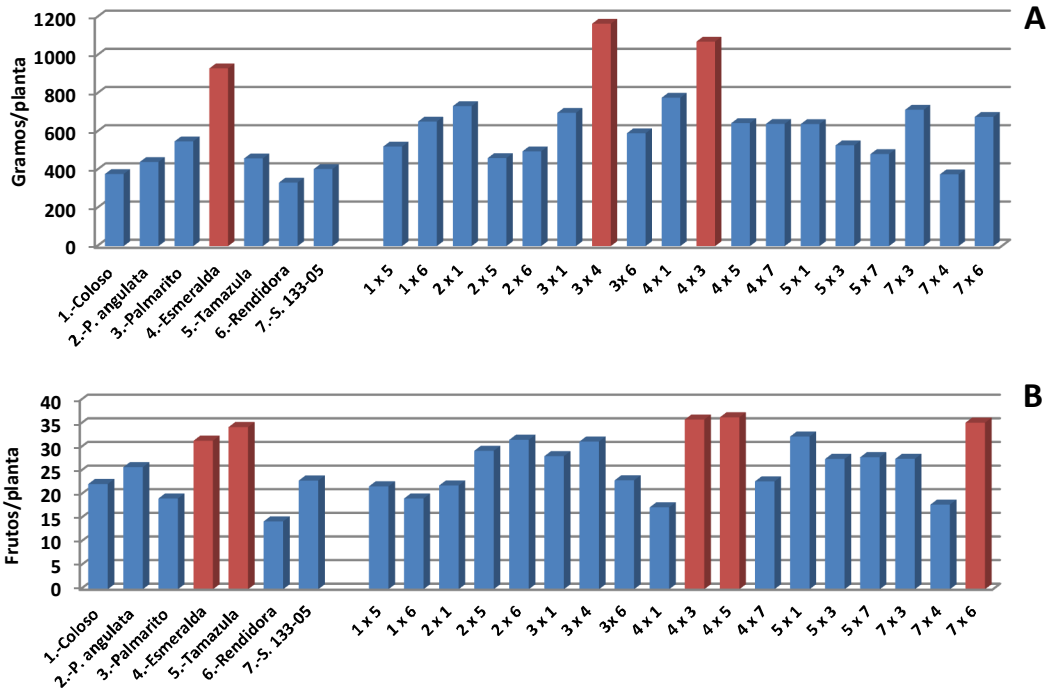


Figura 1.- (A) Rendimiento total de fruto los progenitores y sus híbridos de tomate de cáscara (B) Número de frutos por planta los progenitores y sus híbridos de tomate de cáscara

Calidad de fruto de híbridos y progenitores

En el análisis de varianza aplicado a las variables de calidad de fruto, se encontraron diferencias significativas (P≤0.01) para SST y VC, indicando que entre los progenitores e híbridos presenta amplia variabilidad. En SST ningún de progenitor superó los 6 °Brix, sin embargo los híbridos, 2x5, 2x6, 3x1, 3x6, 4x7, 5x1, 5x3, presentaron un valor superior a 6° Brix, mientras que los híbridos 5x7 y 7x3, tuvieron el menor contenido de azucares (Figura 2). En los progenitores los valores de VC fueron de (3.52-4.40 mg/100g), para los híbridos se presentaron de (2.93 a 4.99 mg/100g), sin embargo se encontró que *P. angulata* fue el progenitor con mayor contenido y fue estadísticamente igual al híbrido 7x4 que presentó la mayor cantidad de VC, superando en 6% a *P. angulata.* (Figura 2). No se encontraron diferencias significativas en la variable FF. Los resultados de VC son relevantes, ya que esta vitamina tiene una función importante en la nutrición debido a que es un antioxidante que contribuye a la salud humana y se le atribuye el fortalecimiento del organismo en defensa de enfermedades cardiovasculares [10]. Lo cual coincide con [11] quienes indican que para el consumidor, la calidad del tomate viene determinada por atributos como apariencia externa, sabor y características nutritivas, además de SST, acidez y tamaño de fruto, de las cuales depende también el precio en el mercado.

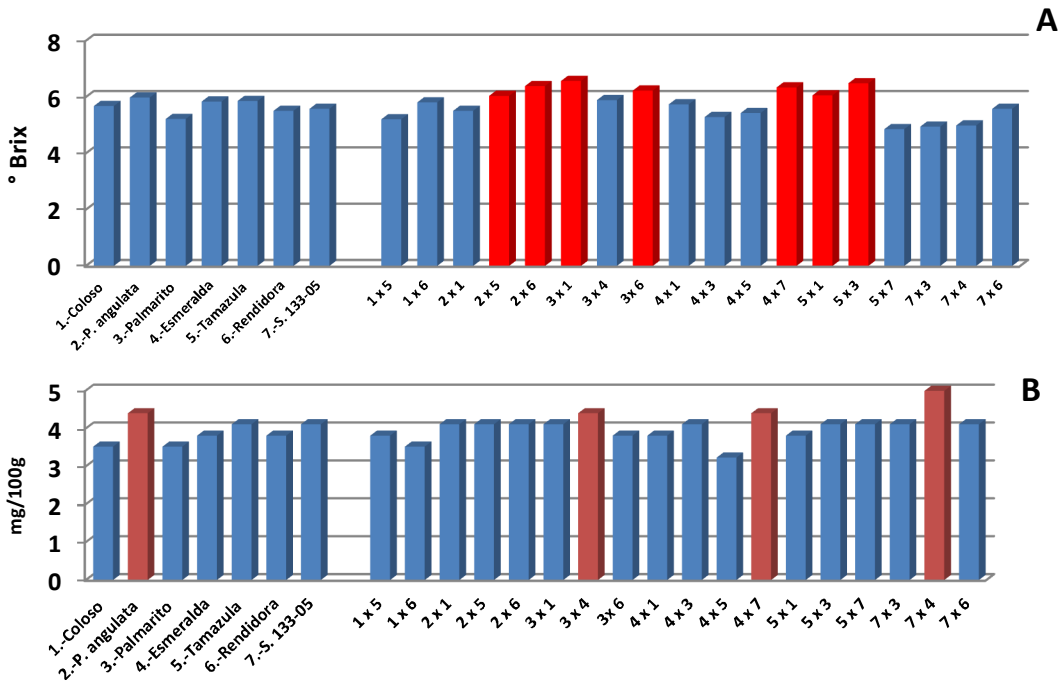


Figura 2.- (A) Sólidos solubles totales en ° Brix de fruto de progenitores y sus híbridos de tomate de cáscara (B) Contenido de Vitamina C en fruto de los progenitores y sus híbridos de tomate de cáscara.

Heterobeltiosis

La heterobeltiosis para componentes del rendimiento y calidad de fruto generó información sobre el potencial de los progenitores estudiados y de sus híbridos para el mejoramiento genético del tomate de cáscara. Para el carácter rendimiento de fruto las cruzas 1x6 y 2x1 y 7x6 presentaron los mayores valores de heterobeltiosis, destacando el híbrido 1x6, que superó en 72.66% al mejor progenitor, indicando que entre los progenitores utilizados existen genes se complementa adecuadamente, aunque estos híbridos superaron al mejor progenitor los valores de heterobeltiosis fueron menores a los encontrada en los híbridos planta a planta [6], pero si fueron superiores a los valores de heterobeltiosis encontrada en los híbridos desarrollados por [12]. En la variable de PPF el híbrido 2x1 fue el que presentó el valor más alto en heterobeltiosis con un valor de 78.40% de incremento respecto al mejor progenitor, indicando la diversidad entre los progenitores que formaron dicho híbrido, ya que el progenitor *P. angulata*, combinó adecuadamente con el progenitor Coloso. En la variable NFP se encontró que el híbrido 7x6 presentó una heterobeltiosis de 53.19% indicando que para dicha variable los progenitores utilizados presentan genes que se manifiestan en híbridos con alto número de frutos, [6] resultados similares se encontraron en cruzas planta x planta entre las variedades CHF1-Chapingo y Verde Puebla de tomate de cáscara, obteniendo en rendimiento total una heterosis promedio de 0.36 kg/planta (21.4 %) y la heterobeltiosis en la mejor cruza (C127) fue de 0.82 kg/planta (40.6 %), la cual rindió 2.84 kg/planta, la heterobeltiosis de la mejor cruza varió de 0.7 a 19.2 %, obteniendo híbridos planta a planta que superan al mejor progenitor. El tamaño de fruto está determinado por las variables DPF y DEF y en el presente estudio se encontró que el híbrido 1x5, 2x1 y 5x1 presentaron altos valores de heterobeltiosis, resaltando que el progenitor Coloso y Tamazula en su cruza directa como reciproca

permiten lograr incrementos en el tamaño de fruto por encima de su mejor progenitor que fue el Coloso.

CONCLUSIONES

En los componentes del rendimiento se encontraron altos valores de heterobeltiosis lo cual indica la posibilidad de encontrar cruzas que permiten un incremento de las variables bajo estudio en relación a los progenitores estudiados. Los híbridos con mayores valores de heterobeltiosis en componentes de rendimiento y calidad de fruto fueron el 1x6, 1x5, 2x1, 5x1 y 7x6 lo cual indica que en los progenitores utilizados para formar dichos híbridos pueden ser utilizados para el mejoramiento del rendimiento y calidad de fruto en tomate de cáscara.

REFERENCIAS

[1] G. M. J. Güemes, A. A. Palacios, R. S. Ramírez, P.F. García, P.A. Salazar. Guía para cultivar tomate de cáscara en el estado de Morelos, Folleto para productores No. 29.pp. 9-11. 2001.

[2] SIAP-SAGARPA. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. www.siap.sagarpa.gob.mx. 2016.

[3] L.A. Peña, H.J.F. Santiaguillo. Variabilidad genética de tomate de cáscara en México. Boletín Técnico #2. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 26 p. 1999

[4] L. A.Peña. Parámetros genéticos, respuesta a la selección y heterosis en tomate de cáscara (Physalis ixocarpa Brot.). Tesis de Doctorado en Ciencias en Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo Edo. de México. p 151.1998.

[5] H.J.F. Santiaguillo, S.T. Cervantes, L.A. Peña. Selección para rendimiento y calidad de fruto de cruzas planta x planta entre variedades de tomate de cáscara. Revista Fitotecnia Mexicana. 27:85-91. 2004.

[6] M. E.Gordillo, M.J.G. Ramírez, D. J. Hernández, T V. Robledo, S. M.M. Murillo. Estudio de progenitores e híbridos de tomate de cáscara. Revista Agrofaz.6(2): 163-170. 2006

[7] AOAC. Official methods of analysis, 17thed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD. 2000.

[8] O.Bartkaite. Evaluation of Tomato Heterosis Expression. Scientific Works. Horticulture and Vegetable Growing. Lithuanian Institute of Horticulture. Babtai, Kaunas district, Lithuania. pp:10-12. 2001

[9] L.A. Peña, MG Contreras, P.J.E. Rodríguez, C.A. Carballo, P.J.E. Rodríguez, M.M Maldonado. Parámetros Genéticos de tomate de cáscara (Physalis ixocarpa Brot.) Variedad Verde Puebla. Revista Fitotecnia Mexicana 27 (1):1 – 7. 2004.

[10] A.C. Carr and B.Frei. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. American Journal of Clinical Nutrition 69(6): 1086-1107.1999.

[11] C. A.González, S.M. del C Salas, G. M. Urrestarazu. Producción y calidad en el cultivo de tomate cherry, pp. 703-747. In: Tratado de Cultivos sin Suelo. Urrestarazu Gavilán, M. (ed.).Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 2004.

[12] L.A. Peña, G.J.D. Molina, S.T. Cervantes, S.F. Márquez, C.J. Sahagún, C.J. Ortíz. Heterosis intervarietal en tomate de cáscara (Physalis ixocarpa Brot.). Revista Chapingo Serie Horticultura 4(1):45-49.1998.

EL USO DE PORTAINJERTOS EN LA PRODUCCIÓN DE PIMIENTO EN INVERNADEROS DE MEDIANA TECNOLOGÍA.

[1*]Robledo-Torres, V., [2]García-León, Á., [3]Ramírez-Godina, F., [1]Mendoza-Villarreal R., y [1]Camposeco-Montejo, N.

1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila.
2. Tecno-Parque Hortícola Fidesur, San Joaquín, Municipio de Galeana, Nuevo León.
3. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila.

*Autor para correspondencia: robledo3031@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La actividad agrícola es cada vez más compleja por los múltiples factores que influyen en la producción de cultivos, sin embargo el uso de genotipos con tolerancia a factores adversos como el uso de portainjertos son una alternativa en la agricultura protegida, donde no es posible hacer rotación de cultivos. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue: identificar portainjertos e híbridos de pimiento con alto potencial de rendimiento en invernaderos de mediana tecnología, para lo cual se establecieron 12 genotipos sin portainjerto y cuatro con portainjerto, bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. El análisis de varianza exhibió diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre genotipos, en rendimiento, firmeza, número de frutos y lóculos en fruto. Se encontró que el uso de portainjertos no influyó significativamente en el rendimiento o calidad de fruto. Por lo tanto se concluye que el híbrido Morraine sin portanjerto y un RF de 30.62 $Kg \cdot m^{-2}$ y el Mysterio con 276.67 $g \cdot fruto^{-1}$, son los híbridos más adecuados para producción en la región de Galeana, Nuevo León. En suelos sin problemas de enfermedades, salinidad o falta de agua no se justifica el uso de los portainjertos estudiados.

Palabras clave: *Capsicum annuum*; agricultura protegida; híbridos; rendimiento de fruto; injertos.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la población humana crece a un ritmo exponencial y en consecuencia una demanda proporcional de alimentos, al tiempo que los espacios para la producción agrícola se reducen por el crecimiento de los asentamientos humanos, ante esta problemática se busca desarrollar mejores tecnologías de producción agrícola, como la agricultura protegida, que en México ha presentado un desarrollo acelerado. Alcanzando 23,482 has de agricultura protegida en el 2014 [1], en éstos ambientes de producción se tiene una mejora continua en el rendimiento de las cosechas, para satisfacer las exigencias y requisitos de calidad que demandan los mercados internacionales. En estos sistemas de producción los cultivos más importantes son los tomates, pimientos y pepinos. El cultivo del pimiento representa el 13% de la superficie sembrada en condiciones de agricultura protegida en el país, solo superado por el cultivo de tomate el cual se cultiva en un 47% y pepino con 29% [1]. En México la mayor

parte de la producción de pimiento morrón se exporta hacia los Estados Unidos de América y Canadá, estas exportaciones han venido en ascenso [2]. Por lo tanto una preocupación permanente de los agricultores, es incrementar la producción y calidad de las cosechas, cumpliendo con las normas de inocuidad alimentaria. Ante esta situación, se busca reducir la aplicación de pesticidas y fertilizantes y una opción con mucho potencial es el uso de portainjertos con resistencia a ciertos patógenos y con tolerancias a varios tipos de estrés biótico [3], [4] o abiótico, lo que permite reducir el uso de agroquímicos, ya que la técnica de injerto en hortalizas ha sido reconocida en todos los ámbitos agrícolas a nivel mundial, puesto que es una técnica muy eficaz, limpia y cuyo uso implica un nulo impacto ambiental [5], que puede tener un efecto positivo en el rendimiento, tiempo y calidad de la fruta cosechada [6], [7]. Por lo que es necesario que la combinación portainjerto-injerto sea seleccionada cuidadosamente para condiciones climáticas y suelo de cada región. Una selección apropiada de dichos materiales genéticos puede ayudar a reducir la incidencia de enfermedades que afectan la raíz, incrementar y mejorar la calidad de fruto y prolongar los ciclos de cosecha, manteniendo la calidad.

Se ha demostrado que el uso de plantas injertadas en melón, sandía, pepino y tomate incrementa el rendimiento por hectárea, con menores densidades de plantación dando mayor calidad de fruto [8], también se ha demostrado que con el uso del portainjertos Terrano, se obtuvieron incrementos en rendimiento de hasta el 50 % en las híbridos Fascinato y Janette y una disminución del 44 % en incidencia de *P. capsici* [9], [10]. Debido a lo anterior se planteó como objetivo, evaluar el rendimiento y calidad de fruto en variedades, híbridos y materiales injertados e identificar el genotipo con mayor potencial de rendimiento y calidad de fruto para cumplir con las exigencias del mercado de exportación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de área de trabajo y variedades estudiadas

El experimento se llevó a cabo en un invernadero de mediana tecnología con una superficie de 2500m^2, la localidad San Joaquín, municipio de Galeana, Nuevo León, con las siguientes coordenadas 24°59'07.63"N 100°28'52.12"W.

El material genético utilizado fueron 12 genotipos sin portainjertos: (Bunker, Artillero, Viper, Triple 5 y Dicaprio, Karisma, Revolution, Mysterio, Morraine, Mecate, 7556, E20b.10135). También se evaluaron cuatro genotipos con portainjertos siguientes: (Bunker/Scarface, Bunker/E10144, Viper/E10144 y Triple 5/Scarface), originando 16 tratamientos.

Para la desinfección del suelo previo al trasplante fue aplicado dicloropropano y cloropicrina vía riego, el cual se dejó actuar por 16 días, posteriormente realizó el trasplante a doble hilera con una distancia entre plantas de 30 cm a doble hilera en tresbolillo.

Cuando las plántulas injertadas y sin injerto alcanzaron una altura de aproximadamente 14 cm, fueron trasplantadas en camas de 27.5m de largo y 40 cm de ancho en la parte superior y de 1.90 m entre camas, en las cuales se instalaron dos cintillas de riego calibre 8000 con goteros cada 20 cm y con un gasto de un l hr^{-1} de agua, previamente acolchadas con polietileno color gris. El trabajo experimental se realizó con un diseño de bloques completamente al azar con 16 tratamientos (12 variedades si injertar y 4 injertados) y tres repeticiones.

Mediciones de rendimiento de fruto y sus componentes

La cosecha se inició a los 85 días después del trasplante. El rendimiento de fruto (RF), se estimó pesando todos los frutos por planta de la parcela útil, mediante una balanza digital de precisión SARTORIUS modelo TS 1352Q37 y posteriormente se estimó el rendimiento total por metro cuadrado ($kg.m^{-2}$), realizando dos cortes por semana, cortando únicamente frutos que presentaran más del 50% de coloración. Después de pesar los frutos se contaba el número de frutos que se cosecharon por parcela útil y se estimó el número de frutos por metro cuadrado a lo largo del ciclo de cultivo (NFP). El peso promedio de fruto (PPF), se calculó dividiendo el peso total de frutos por parcela útil entre número total de frutos por parcela, mientras que el diámetro ecuatorial y longitud del fruto (DEF y LF) fue estimado tomando al azar ocho frutos por parcela semanalmente, utilizando para ello un vernier digital marca Autotec®.

Mediciones de calidad de fruto

Para estimar el contenido de sólidos solubles totales (SST) se utilizó un refractómetro digital Atago Poket Pa-1® con escala de medición de 0 a 53% y expresada en (%). La firmeza de fruto (FF) se determinó con un penetrómetro Fruit Hardness Tester digital marca EXTECH modelo FHT200®, con una puntilla de 8 mm, datos expresados en $Kg \cdot cm^{-2}$, el número de lóculos (NL) se calculó de manera visual contando la cantidad de protuberancias expuestas en los frutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza muestra diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en número de lóculos (NL), peso promedio de fruto (PPF), firmeza de fruto (FF), rendimiento (RF) y número de frutos (NFP), no así para longitud de fruto (LF), diámetro ecuatorial (DE) y sólidos solubles totales (SST). La comparación de medias (Tukey, 0.05) para la variable NL, muestra que todos los genotipos fueron estadísticamente iguales, excepto el genotipo Mecate que presentó en promedio 2.33 lóculos por fruto. Lo antes mostrado indica que en general no hay diferencias significativas entre genotipos en ésta característica y el uso de portainjertos no influye sobre ésta variable, ya que esta característica está determinada por el genotipo, más que por efecto de variables ambientales. Por lo tanto desde el proceso de selección se deberá de fijar dicha característica, ya que entre los criterios de calidad más importantes para pimiento, se encuentran los frutos con 3 o 4 lóculos, por lo tanto las variedades que presentan este número de lóculos son consideradas de calidad [11] . El peso del fruto de pimiento (que está relacionado con su tamaño) es una variable muy importante, pues determina el precio del producto [12], en éste trabajo se encontró que Mysterio fue el que presentó mayor PPF con 276.67 g, aunque fue estadísticamente igual a diez tratamientos más, también se encontró que los pimientos con portainjerto fueron estadísticamente iguales a los pimientos sin portainjertos, indicando que el portainjerto no influyo sobre ésta variable. El genotipo Viper fue el que presentó el menor PPF sin embargo no difiere estadísticamente del mismo híbrido con portainjerto, esto confirma la aseveración antes realizada (Cuadro 1), y aunque se señala que los portainjertos deben de presentar algunas ventajas como amplio desarrollo radicular para tolerar algunos factores de estrés, en éste trabajo los portainjertos no mostraron un comportamiento superior a los híbridos estudiados.

La firmeza es un indicador de calidad que está claramente relacionado con el tiempo de conservación del pimiento. Por esta razón, los valores elevados de firmeza son deseables para productos que tienen que transportarse a largas distancias, antes de llegar al consumidor final [13]. En esta variable destaca el injerto Bunker/Scarface con un valor de 4.49 kg cm^{-2}, aunque fue estadísticamente igual a otros ocho tratamientos, en firmeza de fruto también se observa que los pimientos con portainjerto fueron

estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$) a los pimientos sin portainjertos, también se observa que el pimiento Viper fue uno de los pimientos con menor FF y fue estadísticamente igual al pimiento con portainjerto, confirmando lo observado en otras características antes citadas. En otro trabajo con pimientos se encontraron valores entre 3.5 a 3.9 kg cm^{-2}, mencionando que ésta variable está determinada por un mayor grosor en la pared del fruto y por consecuencia mayor resistencia a la deformación [14].

El genotipo Morraine exhibió el mayor RF con 30.62 Kg m^{-2}, pero este fue estadísticamente igual a tres genotipos mas, mientras que Triple 5/Scarface fue el que presentó el menor RF y fue estadísticamente igual a ocho genotipos mas, se encontró que el genotipo Morraine superó en 68.9% al injerto Triple 5/Scarface. Sin embargo en esta variable no fue posible observar rendimientos superiores en los híbridos con portainjerto en comparación con los híbridos sin injerto, contrastando con lo reportado por [15] quienes obtuvieron incrementos del 25% o superiores en pimiento injertado, respecto a pimientos sin injertar, se han reportado incrementos en rendimiento de hasta 50% de en los híbridos Facinato y Janette injertados con el portainjerto Terrano [9] y [10].

Finalmente en el NFP la variedad Morraine fue la que presentó el mayor NFP con 140.3 frutos·m^{-2}, mientas que Mysterio presentó el menor NFP y fue superada en 57.75% por el genotipo Morraine. Estos valores son mayores a los obtenidos por otros investigadores [16] donde su mayor NF fue de 64.8 frutos m^{-2} en el híbrido Orión, cifra que se aproxima al número más bajo de frutos producido por el genotipo Mysterio evaluada en la presente investigación.
Dado que los portainjertos tienen como función, proporcionar algunas ventajas al injerto ante condiciones de estrés por salinidad, falta de agua o presencia a patógenos, sin embargo la falta de diferencias entre plantas injertadas y sin injertar puede ser el resultado de que los factores antes indicados no se presentaron.

Cuadro 1. Comparación de medias de los parámetros de rendimiento y calidad de fruto en 12 genotipos sin portainjertos y cuatro con portainjertos de pimiento morrón, evaluado bajo invernadero de mediana tecnología.

Material genético	Número de lóculos	Peso de fruto (g)	Firmeza ($Kg.cm^{-2}$)	Rendimiento ($kg.m^{-2}$)	Número de frutos (m^2)
Bunker/ scarface	4.00a	255.00ab	4.49a	26.39abc	104.00bcd
Bunker/ E10144	3.66a	233.33abc	3.84abc	25.34bcd	108.67bc
Viper/E10144	4.00a	220.00bc	2.78f	22.24cdef	101.00bcd
Triple5/ scarface	3.33ab	233.33abc	3.27abcdef	18.13f	77.67de
Bunker	3.33ab	237.78abc	3.72abcde	23.61bcde	99.33bcde
Viper	3.66a	194.17c	2.78f	19.24ef	99.33bcde
Triple 5	4.00a	241.67abc	3.91ab	22.32cdef	93.00bcde
Artillero	3.44ab	236.67abc	3.72abdce	24.65bcd	104.33bcd
Dicaprio	3.89a	237.22abc	3.17bcdef	21.69def	92.00bcde
Karisma	3.66a	226.67abc	3.44abcdef	18.63f	82.33cde
Revolution	3.33ab	223.33abc	2.85def	20.06ef	89.67bcde
Mysterio	3.66a	276.67a	3.19bcdef	19.62ef	71.33e
Mecate	2.33b	203.33bc	3.55abdef	18.24f	91.33bcde

7556	3.33ab	241.67abc	2.91cdef	26.38abc	110.33bc
Morraine	4.00 a	218.33bc	2.61f	30.62a	140.33a
E20b.10135	3.89 a	241.11abc	3.78abcd	27.15ab	112.67ab
Significancia	**	**	**	**	**
CV (%)	11.17	7.83	9.36	6.34	9.52
Dms	1.23	55.162	0.96	4.41	28.07

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey.

En cuanto a la LF y DEF no se encontraron diferencias significativas, estos resultados difieren a los obtenidos por otros autores [15] quienes encontraron diferencias significativas para DEF al utilizar el injerto Janette/Terrano, mientras que para Fascinato/Terrano y Janette/Terrano reportan valores más altos en longitud de fruto, en relación a las mismas variedades sin injertar.

CONCLUSIONES

Se logró la cuantificación del rendimiento de los 16 tratamientos logrando obtener datos contundentes que permiten dar opciones para la elección del material vegetal más adecuado para la producción en Galeana, Nuevo León.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación no se recomienda utilizar híbridos con portainjertos, ya que su uso no mejoró el rendimiento ni la calidad de fruto.

El genotipo de mayor rendimiento (30.62 Kg/m^2) y número de frutos (140.33 frutos/m^2), fue Morraine, por lo tanto es una opción viable para su establecimiento, siempre y cuando el mercado no sea muy distante ya que presentó una baja firmeza de fruto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/superficie_agricola_protegida.aspx.2017.

[2] Z. J. Castellanos, C.M. Borbón. Panorama de la Horticultura protegida en México. Manual de Producción de Tomate en Invernadero. Castellanos, J.Z. (ed.). Intagri. Guanajuato, México. 1-18 pp, 2009.

[3] F.J. Louws, C. L. Rivard, C. Kubota. Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Scientia Horticulturae* 127: 127-146. 2010.

[4] G. Colla, Y. Rouphael, M. Cardarelli, A. Salerno, E. Rea. The effectiveness of grafting to improve alkalinity tolerance in watermelon. Environ. Exp. Bot. 68:283-291. 2010.

[5] S.R.King, A.R. Davis. X. Zhang, K. Crosby. Genetics, breeding and selection of rootstock for solanaceae and cucurbitaceae. Scientia Horticulturae.127:106-111. 2010.

[6] D. Schwarz, Y. Rouphael, G. Colla, J. H. Venema. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: thermal stress, wáter stress and organic pollutants. Scientia Horticulturae. 127 (2):162-171. 2010.

[7] Ma. C. Martinez Ballesta, C. Alcaraz López, B. Muries, C. Mota Cadenas, M. Carvajal. Physiological aspects of rootstock-scion interaction. Scientia Horticulturae. 127(2):112-118. 2010.

[8] M. L. García Bañuelos, E. Sánchez Chávez, A. A. Gardea Bejar, J. M. Parra, E. Muñoz Márquez, M. García Carrillo. Cultivares injertados de pimiento morrón con uso eficiente de nitrógeno para

mejorar la producción. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Publicación Especial Número 17. 3491–3507. 2016.

[9] M.E. Muñoz, C. E. Sánchez, A. A. Guevara. B.M.L. García. Impacto del uso de portainjerto sobre el rendimiento en chile pimiento morrón. Cartel Área/Tema: Horticultura/Fisiología y Nutrición vegetal. 2011.

[10] C. E. Sánchez, A. Torres, M. A. Flores, P. Preciado, C. Márquez. Uso de portainjerto sobre el rendimiento, calidad del fruto y resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento morrón. Revista Electrónica Nova Scientia, 15. 7(3):227– 244. 2015.

[11] O. Pérez. El pimiento de Herbón: cultivo y comercialización. Obtenido de http://www.campogalego.com/es/huerta/el-pimiento-de-herbon-cultivo-y-omercializacion/, el día 09 de enero de 2017. 2015.

[12] J. E. Monge. Efecto de la poda y la densidad de siembra sobre el rendimiento y calidad del pimiento cuadrado bajo invernadero en Costa Rica Effect of pruning and plant density on yield and 29, 125–136. 2016.

[13] A. Moreno-Reséndez, R. Parcero-Solano, N. Rodríguez Dimas, L. Salas-Pérez, M.R. Moncayo-Lujan, J. M. Nava Santos. Calidad y potencial antioxidante del pimiento morrón desarrollado con abonos orgánicos y arena en invernadero. Memorias del XL Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. 2015.

[14] M. Guerra, R. Magdaleno and P.Casquero. Efffect of site and storage conditions on quality of industrial fresh pepper. Scientia Horticulturae. 130 (1), 141–145. 2011.

[15] M. J. López, A. Gálvez, I. Porras, J. M. Brotons. Injerto en pimiento (*Capsicum annuum*): Beneficios y rentabilidad de su uso. ITEA 112(2): 127-146. 2016.

[16] C. M. Moreno, R. Mora, F. Sánchez, V. García. Fenología y rendimiento de híbridos de pimiento morrón. Revista Chapingo Serie Horticultura, Vol. XVII, Edición Especial 2, 2011: 5-18. 2011.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS DE FRESA CONTRA BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

[1]*Lucas-Bautista, J.A., [1]Mena-Violante, H.G., [1]Ramírez-Jiménez, M.R., [1]Oregel-Zamudio, E., [1]Angoa-Pérez, M.V., [1]Oyoque-Salcedo G., [2]Molina-Torres, J.

1. Insituto Politécnico Nacional, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán, Justo Sierra 28, Centro 1, 59510 Jiquilpan de Juárez, Mich.
2. Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV Unidad Irapuato, Libramiento Norte Carretera Irapuato León Kilómetro 9.6, Carretera Irapuato León, 36821 Irapuato, Gto.

*Autor para correspondencia: Lukairo21@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Los extractos vegetales han ido tomando mayor importancia como opción para control de fitopatógenos; sus compuestos activos son los metabolitos secundarios de las plantas que sintetizan para relacionarse y defenderse del medio. Entre dichos compuestos se encuentran los flavonoides que han mostrado actividad controladora contra fitopatógenos. Las antocianinas son un grupo abundante de flavonoides responsables de otorgar colores desde el rojo al morado en tallos, flores y frutos de algunas plantas, siendo el fruto de la fresa uno de los que más contiene. Estudios recientes atribuyen la actividad antimicrobiana a dichos compuestos. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de antocianinas de fresa contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas vesicatoria* y *Pseudomonas syringae*. Para ello, se extrajeron antocianinas de frutos de fresa de cinco variedades comerciales, y se confrontaron con las bacterias por difusión en disco teniendo como controles antibióticos comerciales. Los extractos antociánicos de las cinco variedades de fresa mostraron poder inhibitorio contra ambas bacterias superando a los tratamientos comerciales sintéticos.

Palabras clave: Metabolitos secundarios; Antocianinas; *Fragaria ananassa; Xanthomonas vesicatoria*; *Pseudomonas syringae.*

INTRODUCCIÓN

Las plantas, al ser organismos sésiles, destinan parte de su energía en la fabricación de compuestos químicos que les permiten relacionarse con el ambiente; dichos compuestos, denominados metabolitos secundarios, tienen diversas funciones al ser sintetizados para comunicarse con otros organismos y ser utilizados como mecanismo para repeler o atraer insectos o como protección ante ciertos efectos del ambiente e, incluso, para evitar la multiplicación y ataque de microorganismos fitopatógenos [1]. Este hecho está siendo investigado para su aplicación en la agricultura y el control de enfermedades por agentes biológicos [2].

La variabilidad estructural que presentan los metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas (hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y glucosilación) a una estructura básica. Actualmente, existen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos

secundarios que se agrupan de acuerdo a su composición química básica en terpenos, alcaloides, glicósidos y compuestos fenólicos [3].

Los compuestos fenólicos son los principales metabolitos secundarios de las plantas; entre éstos destaca el grupo de los flavonoides que, entre otras propiedades, presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica, antiviral y anticancerígena, previniendo enfermedades como la diabetes y padecimientos cardiovasculares [4]. Aunado a ello, algunos flavonoides actúan también como antimicrobianos tanto en humanos como en plantas, mediante la destrucción total del patógeno o atenuando su actividad, inhibiendo la síntesis de peptidoglicanos y ribosomas [5].

Dentro del grupo de los flavonoides, se encuentran las antocianinas, las cuáles, confieren las tonalidades que van desde el rojo hasta el morado en flores, tallos y frutos de algunas plantas [6]. Gracias a esta pigmentación, poseen funciones de atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y se les atribuye protección contra los efectos de la radiación ultravioleta [7].

Químicamente, son polihidroxilados glucósidos o acilglicósidos polihidroxilados de antocianidinas derivados del ión flavilio (2-fenil-benzopirilio) que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); distinguiéndose, pues, de otros flavonoides debido a su capacidad para formar cationes flavilio. Es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β-glucosídico, siendo los más distribuidos en la naturaleza los 3-monósidos, 3-biósidos, 3-5 y 3-7 diglucósidos y 3-glucósido; éste último, el más frecuente [6].

Recientemente, el interés por los pigmentos antociánicos ha aumentado debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas; cuando son consumidas, son incorporadas al torrente sanguíneo permaneciendo intactas, confiriendo efectos benéficos para la salud [7].

Diversos estudios han confirmado su potencial antioxidante siendo capaces de atrapar radicales libres en sistemas biológicos y prevenir enfermedades cardiovasculares y crónico degenerativas como el cáncer y la diabetes [8]. Asimismo, se apunta a las antocianinas como responsables de presentar actividad antimicrobiana [9].

Entre las plantas que sintetizan antocianinas, las frutillas son de las de más alto contenido, incluido el fruto de la fresa, siendo la pelargonidina y la cianidina las más abundantes [10]. La fresa ha sido motivo de investigación debido a sus propiedades medicinales, pero recientemente, se está indagando su potencial antimicrobiano debido al contenido de antocianinas que posee [11]. Sin embargo, aún no se conoce su efecto inhibitorio contra bacterias fitopatógenas.

Los géneros principales de bacterias fitopatógenas que atacan a los cultivos son: *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Strepthomyces* y *Xyllela* [12]. Según datos de la Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología para el Desarrollo Rural Sustentable, en Michoacán, las bacterias fitopatógenas más comunes son *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria* [13].

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de antocianinas de frutos de fresa contra las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para la obtención de extractos antociánicos, se utilizaron frutos de fresa de las variedades Albión, Festival, Camino Real, San Andreas y Frontera cultivados en un invernadero de Zamora, Michoacán. Los frutos se cosecharon en un grado de maduración 5 según la norma mexicana NMX-FF-062-SCFI-2002.

Las bacterias fitopatógenas evaluadas fueron: una cepa de *Pseudomonas syringae* perteneciente al cepario del CIIDIR IPN Unidad Michoacán, y *Xanthomonas vesicatoria* perteneciente al cepario del CUCBA, Guadalajara. Las cepas se mantuvieron en agar B de King (KB) y en agar nutritivo (BIOXON, Nueva Jersey, EUA), respectivamente, a 24°C bajo resiembras continuas de 30 días.

Extracción de antocianinas totales

La extracción de antocianinas totales a partir de fruto fresco de fresa se realizó siguiendo la técnica descrita por Abdel-Aal y Hucl [14]; la cual consistió en tomar 1 g de muestra y 5 mL de etanol acidificado (etanol (MEYER, CDMX, México) y HCl (Fermont, Monterrey, México) 1N; 85:15 v/v) para su posterior maceración en mortero. Se agitaron las soluciones vigorosamente en un vórtex (Scientific Industries, Nueva York, EUA, modelo Vortex-Genie 2) y se ajustó el pH a 1 con ácido clorhídrico al 1N utilizando un potenciómetro (HANNA Instruments, Guadalajara, México, modelo HI 2211 pH/ORP meter) y se continuó la extracción en un agitador orbital digital (Sea Star, Navarra, España, modelo HS) a 250 rpm durante 16 h a 16 °C. Transcurrido este tiempo, los extractos se centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min en una centrífuga (Thermo Cientific, Massachusetts, EUA, modelo Haraeus Mefague 8) para recuperar el sobrenadante, el cual fue filtrado al vacío utilizando papel Whatman #1.

Finalmente, se eliminó el disolvente de la muestra usando un concentrador de sustancias (Biotage, North Carolina, USA, modelo TurboVap LV). Para ello, se colocaron, por cada variedad 5 tubos de vidrio con 10 mL del extracto correspondiente, a una presión de 15 mbar y a una temperatura de 45 °C durante 60 min.

Ensayos de inhibición *in vitro*

Los ensayos de inhibición *in vitro* de bacterias fitopatógenas por antocianinas totales de frutos de fresa, se realizaron siguiendo el método de difusión en disco para pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, descrito por Hafidh *et al*., [15] bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar.

Los tratamientos aplicados fueron los extractos de antocianinas totales de cada una de las variedades, disueltos en agua bidestilada estéril, tendiendo como controles agua y etanol acidificado (etanol y HCl 1N; 85:15 v/v) (Tabla 1). De igual manera, se utilizó el bactericida agrícola comercial Cuprimicin 17 (Adama; CDMX., México) cuyo ingrediente activo es sulfato de estreptomicina (0.085mg/100mL) y el antibiótico de Gentamicina en solución (160mg/2mL) Genlex I. U. (RAYERE, CdMx, México).

Tabla 1.Tratamientos utilizados en ensayos de inhibición *in vitro*

Tratamientos aplicados
Agua
Etanol acidificado
Estreptomicina
Gentamicina
Extracto variedad Albion

Extracto variedad Festival
Extracto variedad Camino real
Extracto variedad San Andreas
Extracto variedad Frontera

En la prueba de difusión en disco, utilizando una varilla de vidrio estéril, se distribuyeron uniformemente 100 µL cada la suspensión bacteriana a una densidad de $1x10^8$ UFC sobre la superficie de una caja Petri de 5 cm de diámetro con agar nutritivo para *X. vesicatoria* (BIOXON, Nueva Jersey, EUA) o agar KB para *P. syringae*. Posteriormente, se colocó en el centro de la superficie de la placa un disco estéril de 10 mm de diámetro de papel Whatman #1, al cual se le agregaron 70 µL del tratamiento correspondiente. Todos los tratamientos se repitieron por triplicado.

Las placas se dejaron en incubación durante 72 h a 24 °C. Después, con ayuda de un vernier digital (Stainless hardened), se midió el diámetro del halo de inhibición de los tratamientos que lo presentaron. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:
% de inhibición = (DI/DC)*100
Donde:
DI = Diámetro de inhibición
DC = Diámetro de la caja

Análisis estadístico
A los resultados obtenidos de los porcentajes de inhibición se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la separación de medias, utilizando el programa SAS® versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Los porcentajes de inhibición fueron tomados a las 72 horas de incubación a 24 °C. A continuación, se presentan los resultados en gráficas donde se comparan los tratamientos controles (agua, etanol acidificado, estreptomicina y gentamicina) con los extractos antociánicos de las variedades de fresa.
La figura 1 muestra los resultados obtenidos de la inhibición de *X. vesicatoria.* Se observó que los tratamientos con extractos de fresa de las variedades Frontera, Albion, Festival y Camino real igualaron a la gentamicina. Asimismo, fueron superiores a los tratamientos con estreptomicina y con el extracto de la variedad San Andreas. Los tratamientos de agua y etanol acidificado no presentaron inhibición alguna.

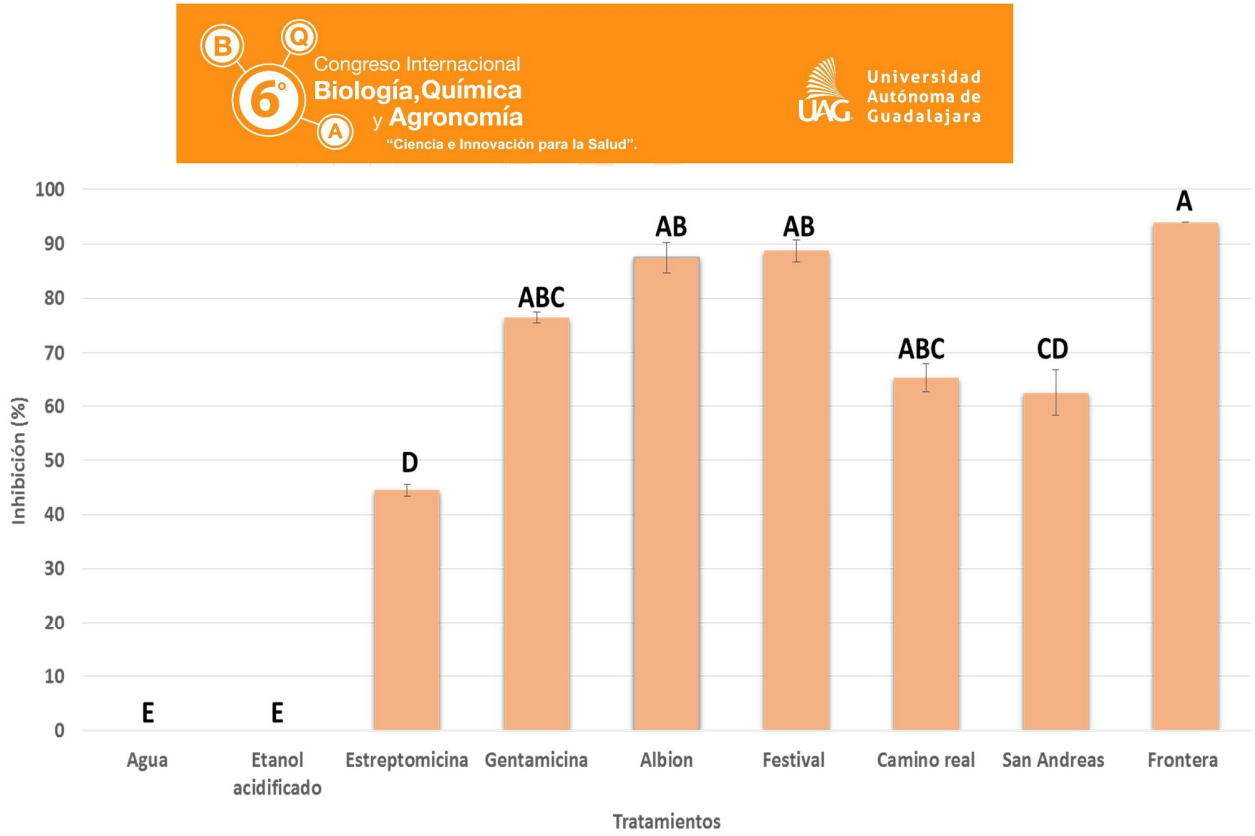


Figura 1. Ensayos de inhibición bacteriana contra *X. vesicatoria* a 72 horas de incubación. Tratamientos: Agua, Etanol acidificado., Estreptomicina, Gentamicina, Extractos de variedades de frutos de fresa Albion, Festival, Camino real, San Andreas y Frontera.

En la figura 2 se presentan los resultados de los porcentajes de inhibición de los tratamientos contra *P. syringae*. El extracto de la variedad Albion igualó al tratamiento con gentamicina. Mientras que los extractos de las variedades de Festival, Camino real, San Andreas y Frontera alcanzaron una inhibición significativamente menor a la gentamicina (entre 13 y 20%). La estreptomicina no presentó inhibición al igual que el etanol acidificado y el tratamiento de agua.

Es de llamar la atención que el bactericida agrícola no tuvo inhibición sobre *P. syringae*, esto podría atribuirse al desarrollo de resistencia de las bacterias a antimicrobianos a través de transferencia vertical y horizontal de genes [16]. Cabrera *et al.* [17] señalaron que tanto las bacterias como todos los seres vivos, están dotados de mecanismos de adaptación a diversas presiones ambientales, siendo la resistencia a elementos tóxicos una expresión natural de la evolución.

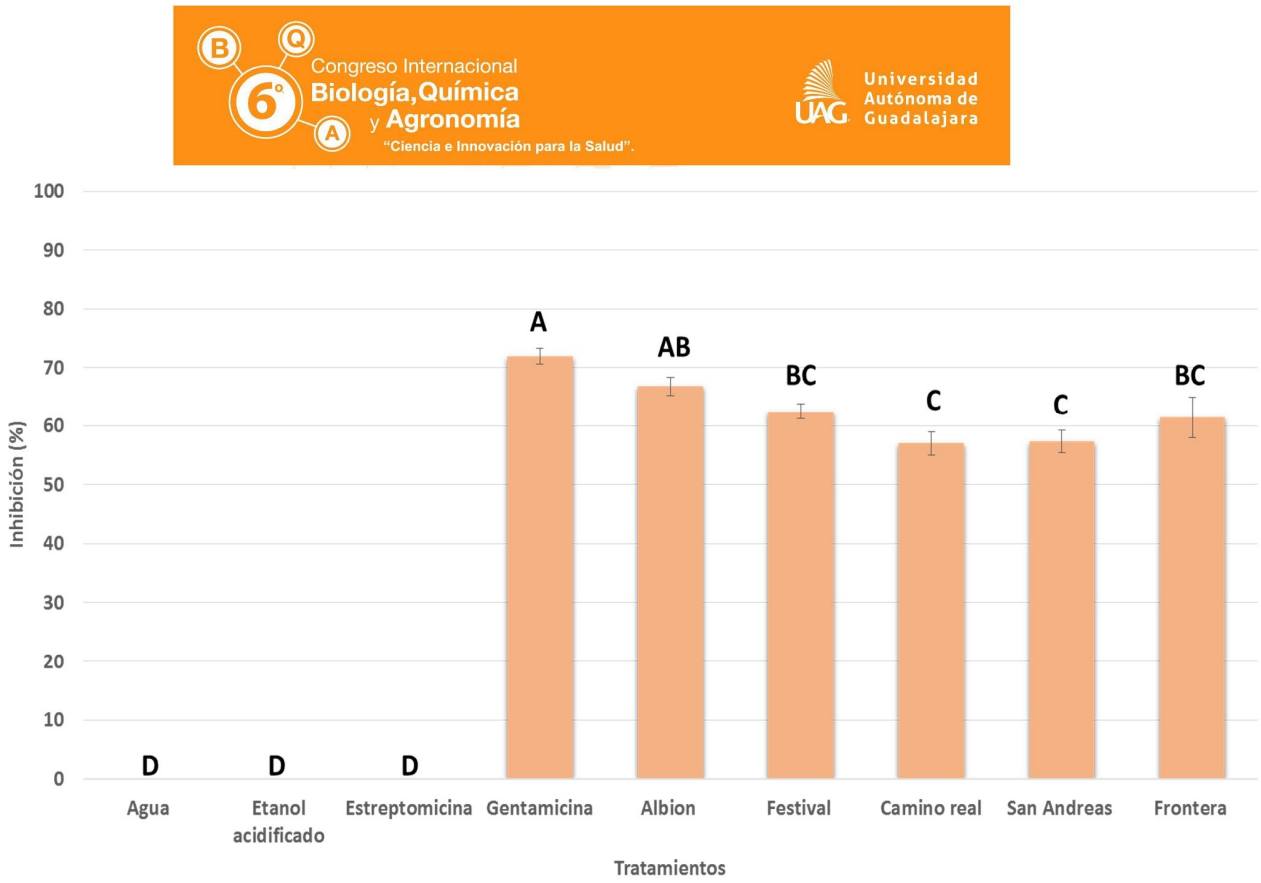


Figura 2. Ensayos de inhibición bacteriana contra *P. syringae* a 72 horas de incubación. Tratamientos: Agua, Etanol acidificado, Estreptomicina, Gentamicina, Extractos de variedades de frutos de fresa Albion, Festival, Camino real, San Andreas y Frontera.

Los porcentajes de inhibición de los tratamientos, en general, variaron entre una bacteria y otra; manifestando mayor efecto en *X. vesicatoria* que en *P. syringae*. Ante esta situación, Chirinos *et al.* [18] aseguraron que el poder de inhibición está relacionado a la bacteria misma y su composición. No se sabe todavía el mecanismo de acción de las antocianinas, pero Domingo y López-Brea [19] consideraron que la acción de los compuestos fenólicos está relacionada con la inhibición enzimática por la acción de los grupos sulfhídricos de sus aminoácidos de cisteína o por interacciones no específicas con proteínas.
Por otro lado, la cantidad de antocianinas presentes en los extractos puede influir en la variación de su acción inhibitoria, pues, según Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán [20], la cantidad de antocianinas es mayor si al cultivo le proporcionan suficiente agua, si está en temperaturas cálidas y si tiene buena irradiación solar; además, las antocianinas son vulnerables a la luz, pH y temperatura durante su conservación. Por lo que la cantidad puede variar por estos factores.

Hacen falta más estudios sobre la actividad antimicrobiana de las antocianinas, tanto en invernadero como en en campo; pues es un reto mantener las condiciones adecuadas para que éstas no se degraden ante las diferentes variantes del ambiente abierto. Sin embargo, la generación de conocimiento sobre la actividad antimicrobiana que tienen estas biomoléculas contra diversas bacterias, constituye información valiosa como la base para futuros desarrollos de control de patógenos.

CONCLUSIONES

- Los extractos antociánicos de frutos de fresa inhiben a *X. vesicatoria* y *P. syringae.*
- Existe un efecto de inhibición distinto entre las variedades de fresa evaluadas.
- Existe un efecto diferencial de inhibición de los extractos antociánicos de las distintas variedades de fresa dependiente de la bacteria con la cual se confronten.

REFERENCIAS

[1] D. Ortiz, R. Noguera, y S. Posada, «Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes.,» *Livestock Research for Rural Development,* vol. 26, nº 11, 2014.

[2] T. Ramírez-Reyes, N. Flores-Estévez, M. Luna-Rodríguez, J. C. Noa-Carrazana, L. R. Sánchez-Velásquez, y Á. Trigos-Landa, «Extractos crudos de *Magnolia schiedeana* Schltdl. para el control de bacterias fitopatógenas,» *Madera y bosques,* vol. 21, nº 2, pp. 159-164., 20

[3] G. Sepúlveda Jiménez, H. Porta Ducoing, y M. Rocha Sosa, «La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas,» *Revista Mexicana de Fitopatología,* vol. 21, nº 3, pp. 355-366, 2003.

[4] M. R. Soto Váquez, «Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas,» *In Crescendo,* vol. 6, nº 1, pp. 33-43., 2015.

[5] Y. Xie, W. Yang, F. Tang, X. Chen, y L. Ren, « Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism,» *Current medicinal chemistry,* vol. 22, nº 1, pp. 132-149, 2015.

[6] A. Castañeda-Ovando, M. L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez, y C. A. Galán-Vidal, «Chemical studies of anthocyanins: A review,» *Food chemistry,* vol. 113, nº 4, pp. 859-871, 2009.

[7] G. A. Garzón, «Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión,» *Acta Biológica Colombiana,* vol. 13, nº 3, pp. 27-36, 2008

[8] S. K. Cosavalente-Bugos, S. G. Ruíz-Reyes, y M. L. Ganoza-Yupanqui, «Antocianinas totales y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano",» *UCV-SCIENTIA,* vol. 8, nº 1, pp. 44-48, 2016.

[9] D. Burdulis, A. Sarkinas, I. Jasutiene, E. Stackevicené, L. Nikolajevas, y V. Janulis, «Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits,» *Acta poloniae pharmaceutica,* vol. 66, nº 4, pp. 399-408, 2009.

[10] A. Basu, M. Rhone, y T. J. Lyons, «Berries: emerging impact on cardiovascular health,» *Nutrition reviews,* vol. 68, nº 3, pp. 168-177, 2010.

[11] D. Huerta, «Efecto antifúngico de antocianinas de frutos de fresa vs hongos fitopatógenos,» Tesis de maestría, Insituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México, 2016.

[12] W. I. Almodóvar, «Enfermedades de las plantas: Organismos patógenos, identificación y diagnóstico,» *Clínica al día,* pp. 1-4,

[13] SNITT, «Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología Agrícola,» 2016. [En línea]. Available: http://www.snitt.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=185&catid=20&Itemid=18

[14] E. S. Abdel-Aal, y P. Hucl, «A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats,» *Cereal chemistry,* vol. 76, nº 3, pp. 350-354, 1999.

[15] R. R. Hafidh, A. S. Abdulamir, L. S. Vern, F. A. Bakar, F. Abas, F. Jahanshiri, y Z. Sekawi, «Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product.,» *The open microbiology journal,* vol. 5, nº 96, p. 96–106, 2011.

[16] O. López Cuevas, J. León Félix, M. Jiménez Edeza, y C. Chaidez Quiroz, «Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y Salmonella en agua y suelo agrícola,» *Revista fitotecnia mexicana,* vol. 32, nº 2, pp. 119-126, 2009.

[17] C. E. Cabrera, R. F. Gómez, y A. E. Zúñiga, « La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación,» *Colombia médica,* vol. 38, nº 2, pp. 149-158, 2007.

[18] J. Chirinos, B. Olivares, y E. Guevara, «Efectividad biológica de extractos vegetales en el control in vitro de la bacteria fitopatógena Xanthomona.,» *Multiciencias,* vol. 13, nº 2, pp. 115 - 121, 2013.

[19] D. Domingo, y M. López-Brea, «Plantas con acción antimicrobiana,» *Rev Esp Quimioterap,* vol. 16, nº 4, pp. 385-393, 2003.

[20] A. Castañeda-Sánchez, y J. A. Guerrero-Beltrán, «Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas,» *Temas selectos de ingeniería de alimentos, pp. 25-33, 2015.*

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD NUTRITIVA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES ARVENSES INCLUIDAS COMO ADITIVO EN LA ALIMENTACIÓN DE OVINOS.

Diaz-Medina, L.K., *Estrada-Flores, J.G., Arriaga-Jordán, C.M. y Brunett-Pérez, L.

Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR). Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto Literario #100 50000 Toluca (México).

*Autor para correspondencia: jgestradaf@uaemex.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

En el Altiplano Central de México una de las actividades económicas que destaca es la producción de ganado ovino en sistemas campesinos. La alimentación de los animales se basa principalmente en el pastoreo en agostaderos naturales y alimentación semi-estabulada; por lo que la búsqueda de otras fuentes alimenticias de buena calidad nutritiva, económicamente viables y de fácil adquisición, es necesaria para mejorar la eficiencia productiva de los campesinos. El uso de especies arvenses en la alimentación de rumiantes ofrece una alternativa al uso de alimentos convencionales y a su vez representa una oportunidad para el manejo de plantas invasoras de terrenos agrícolas. El objetivo de este trabajo es complementar al conocimiento sobre el uso de arvenses como alimento para rumiantes, se evaluaron 3 especies de arvenses (*Tithonia tubiformis*, *Cosmos bipinnatus* y *Tagetes lucida*) y 4 tratamientos (T0= dieta control, T1=dieta+5% *T. lucida*, T2= dieta +5% *C. bipinnatus* y T3= dieta +5% *T. tubiformis*); se determinó el contenido en porcentajes de fibra neutro detergente (FND) y ácido detergente (FAD); la proteína cruda (PC) se determinó por el procedimiento Kjeldahl y los minerales por fuente de plasma inducida (ICP); además se evaluaron compuestos secundarios [1], fenoles (FT), taninos totales (TT) y taninos condensados (TC); y la actividad antioxidante (AA) por los métodos FRAP (ferric reducing/antioxidant power) y ORAC (oxygen radical absorbance capacity); se evaluó la cinética de fermentación ruminal; digestibilidad *in vitro* de materia seca (dMS), materia orgánica (dMO) y FND (dFND) de cada tratamiento a través de la técnica de producción de gas *in vitro* [2, 3]. Los resultados - muestran mayor contenido de PC para *Tithonia*; FND y FAD para *Cosmos*; el contenido de FT es mayor para *Tagetes* y los TC para *Cosmos*, en cuanto a las dietas; al incluir *T. lucida* en la dieta control, el contenido de FT se eleva hasta un 20% , mientras la actividad antioxidante aumenta un 55% y la concentración de minerales tienen resultados más altos para el T3 comprado con la dieta control; no se encontraron diferencias ($p<0.05$) en los parámetros de cinética ruminal, dMS, dMO, dFND y EM, lo que indica que se puede hacer uso de arvenses como aditivo, para aumentar la actividad antioxidante y contenido de minerales en la dieta sin comprometer la bienestar y productividad animal.

Palabras clave: taninos; fenoles; digestibilidad; alimentos no convencionales; minerales

REFERENCIAS

[1] H. Makkar, P. Siddhuraju y K. Becker, «Plant secondary metabolites,» de Methods in molecular biology 393, Totowa, New Jersey: Human Press, 2007, pp. 75-77.

[2] K. H. Menke y H. Steingass, «Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and in vitro gas production using rumen fluid,» Animal Research and Development, vol. 28, pp. 7-55, 1988.

[3] M. Theodorou, B. Williams, M. Dhanoa y A. D. McAllan, «A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds,» Animal Feed Science and Technology , vol. 48, pp. 185-197, 1994.

USO DE LA MICROPROPAGACIÓN VEGETAL COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA MICROBIANA ENDÓFITA Y SUS APLICACIONES EN LAS PLANTAS.

[1]Lee-Ramírez, B., [2]Martínez-Rodríguez, A., [2]Valdés-Salas, B., [2]Valdés-Salas, E., y [1]Beltrán-García, M.

1. Lab 309, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara.
2. Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California.

Autor para correspondencia: boramy_lee_ramirez@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La micropropagación consiste en una serie de técnicas y procedimientos que permiten la obtención de plantas por medio de la manipulación de sus tejidos en condiciones artificiales y controladas. Por medio de ella se pueden obtener líneas clonales a través de la multiplicación de individuos, utilizando diferentes tejidos. Por otro lado los microorganismos endófitos (bacterias y hongos) se encuentran colonizando internamente los tejidos de las plantas y ejercen propiedades benéficas en sus hospedantes. Tanto la micropropagación como los endófitos tienen aplicaciones biotecnológicas con fines de reforestación, preservación de animales, producción de fertilizantes biológicos, así como la posible producción de moléculas antitumorales. Un ejemplo es la producción de antitumorales son los chabacanos. Se sabe que las semillas de chabacano se puede obtener amigdalina, molécula compuesta unidades de azúcar, benzaldehído y cianuro. En las células no tumorales la enzima rodanasa neutraliza el radical de cianuro. En cambio las células cancerosas no poseen esta enzima por lo cual el cianuro es tóxico para ellas. Desconocemos si esta molécula u otras con efectos antitumorales en las semillas de chabacano son producidas por células vegetales o por el endófito. Este proyecto se plantea en función de producir moléculas antitumorales a bajo costo.

Palabras clave: Micropropagación vegetal, Endófitos, Ecología microbiana, Chabacano, Maíz y Agave.

REFERENCIAS

[1] MARTÍNEZ MOLINA, Cristy et al."Microorganismos endófitos ¿amigos o enemigos?" [en línea]. Revista Ciencia y Desarrollo, Vol. 36, no. 242, Abril 2010. Disponible en: http://www.cyd.conacyt.gob.mx/242/Articulos/MicroorganismosEndofitos/Microorganismos1.html

[2] ZUOQING, Song et al. “Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin” [en línea]. Journal of cáncer research and terapeutics, Vol 10, no.5, 2014. Disponible en:

http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2014;volume=10;issue=5;spage=3;epage=7;aulast=Song;aid=JCanResTher_2014_10_5_3_139743.

ALTERACIÓN DE GENES DE LA PARED CELULAR EN RAÍCES DE MAÍZ (*Zea mays*) INDUCIDA POR BACTERIAS ENDÓFITAS: ANÁLISIS POR Q-PCR.

Vargas-Zaragoza, C., González-Chávez, R., Beltrán-García, M.J.

Lab. 309, Departamento de Química-ICET, Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor para correspondencia: caro_vargas_18@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La colonización intercelular por microbios endófitos suele concederle a las plantas condiciones favorables para desarrollarse y entonces llevar a cabo todos sus procesos. Se han buscado entender los mecanismos genéticos que emplean las plantas para sobrevivir a la adversidad ambiental, basados principalmente en los cambios adaptativos del genoma. Teniendo en cuenta lo anterior y con la intención de conocer como es que las bacterias ocasionan una modificación en su hospedante, decidimos estudiar la expresión de genes implicados en la remodelación de pared celular como: extensinas, expansinas, arabinogalactan, celulosa sintasa y xiloglucan endotransglicolasa en la raíz de plantas de maíz mediante el analisis por q-PCR. Usamos como modelos de endófitos cepas de Enterobacter ausburiae, un endófito de maíz y a E. cloacae endófito de banano, con el interés de conocer si es posible que el endófito aislado de otra planta modificque la expresion de los genes implicados con la pared celular. Semillas de maíz se germinaron en papel húmedo y después de tres días se pasaron a sustrato, compuesto de fibra de coco al cual se le adicionaron sales del medio Murashige and Skoog para adaptación y desarrollo de raíz. Se realizó una inducción por 30 minutos al sumergir la planta en una suspensión. Las plantas fueron expuestas por 1, 3 y 6 horas por quintuplicado. Se espera que los genes de arabinogalactano y celulosa sintasa aumenten en respuesta a la presencia de las bacterias, asi como los genes relacionados con la producción de especies de oxígeno reactivas.

Palabras clave: Pared celular, Endófitos, q-PCR, Enterobacter, Maíz.

REFERENCIAS

[1] Zhang, M., Ma, Y., Horst, W. J., & Yang, Z. B. (2016). Spatial-temporal analysis of polyethylene glycol-reduced aluminium accumulation and xyloglucan endotransglucosylase action in root tips of common bean (Phaseolus vulgaris). Annals of Botany, 118(1), 1–9. https://doi.org/10.1093/aob/mcw062

DINÁMICA DE SUCESIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS TRANSMITIDAS POR LA SEMILLA Y LA MICROPROPAGACIÓN DE *Agave marmorata* PARA FINES DE RESTAURACIÓN.

[1*]Martínez-Rodríguez, A., [1]Macedo-Raygoza, G., [2]Lee-Ramirez, B., [2]Guzmán, D., [1]Valdez-Salas, B.

1. Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California
2. Departamento de Química ICET, Universidad Autónoma de Guadalajara

*Autor para correspondencia: america.mr88@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Las especies de Agave, son parte del panorama ecológico de las zonas áridas y semiáridas de México. En los últimos 30 años algunas especies han adquirido importancia económica porque son fuentes de producción de distintas bebidas alcohólicas y de inulina. Este trabajo busca la conservación de distintas especies de Agave y la restauración de los ecosistemas en los que este habita, utilizando sus semillas. Pensamos que la obtención de material vegetal derivado de la semilla, el conocimiento de la ecología microbiana endófita y la micropropagación de líneas clónales, consolidará nuestra idea futura de crear fuentes de material vegetal que puedan sustituir a las variedades cultivadas en casos como: pérdida de productividad, aumento en la susceptibilidad a enfermedades y prevención de extinción de especies silvestres. Como resultados principales después del análisis del microbioma de las semillas de A. marmorata y A. tequilana, encontramos que existen géneros bacterianos importantes para el proceso de germinación de la semilla, para el establecimiento y sobrevivencia de las plántulas. Algunas de las bacterias pudieron ser transmitidas por animales polinizadores. Se determinó la dinámica de sucesión de los microorganismos y se encontró que las bacterias funcionan como promotoras del crecimiento de las plántulas bajo ambientes limitados de nutrientes, lo que refuerza nuestra hipótesis que en ausencia de nutrientes las plantas usan a sus propios endófitos como alimento.

Palabras clave: Agave; bacterias; endófito; micropropagación; ecología microbiana.

REFERENCIAS

[1] Ahmed-Wani, Z., Ashraf, N., Mohiunddin, T. and Riyaz-UI-Hassan, S. Plant-endophytes symbiosis, an ecological perspective. Appl. Microbiol. Biotechnol., 99: 2955-2965, 2015.

[2] Beltran-Garcia et al,. Nitrogen acquisition in Agave tequilana from degradation of endophytic bacteria. Sci. Rep. 4: 6938, 2014.

RESULTADOS DE PARCELAS DE VALIDACION CON SORGO DULCE "SUPERSORGO" EN JALISCO.

Pérez-Domínguez, J.F., Villareal-Rodas, J.H., Arias-Chávez, L.E, Díaz-Mederos, P., & Ireta-Moreno, J.

INIFAP Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Av. Biodiversidad 2470. Tepatitlan de Morelos, Jal. C.P. 47600.

*Autor para correspondencia: perez.juanfrancisco@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El sorgo dulce llamado comercialmente "Súper sorgo" es originario de África, se cultiva a nivel mundial para producción de grano y forraje; sus características más interesantes son: mayor altura y alto contenido de azucares con respecto a los sorgos tradicionalmente usados en México. De acuerdo a los requerimientos agroclimáticos del cultivo para su desarrollo, estos materiales tienen grandes posibilidades de adaptarse a las condiciones de gran parte del país. Por lo anterior el INIFAP establece parcelas para validar el desarrollo de los híbridos, en diversos ambientes de México, en este trabajo se presentan los resultados de éstas parcelas en Jalisco. Se establecieron parcelas en los municipios de Cocula, Ahualulco de Mercado y en Tototlan, una parcela por municipio, a los cuales se les fue adaptando cada componente de manejo para lograr un mejor desarrollo de las variedades. El objetivo del presente proyecto fue validar y transferir tecnología para la implementación de parcelas comerciales de sorgo dulce para producción de biomasa con alto contenido de sacarosa y para la producción de etanol. Fueron evaluados los híbridos MX-01, MX-02, MX-03 y MX-04 y como testigo el RB- Cañero, sorgo de INIFAP. Se evaluaron las variables: días a floración, altura de plantas, % de acame, % materia seca, grados brix, plantas cosechadas, rendimiento de materia verde y rendimiento de materia seca. Se logró establecer con éxito las parcelas de validación en las diversas localidades, de todas se obtuvo valiosa información sobre las características fenológicas de los híbridos de "supersorgo" y sobre el manejo de cada uno de los factores de la producción para conformar paquetes tecnológicos para el manejo del supersorgo según las condiciones de cada localidad bajo estudio. Se generó además información acerca de las variedades mejor adaptadas para cada ambiente bajo evaluación. Los híbridos de supersorgo tuvieron de 66 a 97 días a floración, Grados brix (contenido de azúcares) de 6 a 17 2 semanas después de floración y de 8.2 a 21 a las 4 semanas después de la floración y con rendimientos de materia seca desde 4,12 hasta 16.5 ton/ha. De entre los cuatro híbridos de supersorgo destacó el MX-02 que tuvo de 64 a 70 días a floración, de 13 a 17.3 grados brix dos semanas después de la floración y de 14 a 20.7 grados brix a la cuarta semana después de floración con 16.5 ton/ha.

Palabras clave: Sorgo forrajero, producción, adaptación, supersorgo.

EFECTO DEL DAÑO CAUSADO POR GUSANO COGOLLERO (*Spodoptera frugiperda Smith*) EN LA INCIDENCIA DE PUDRICIÓN DE TALLO (*Fusarium subglutinans*) Y RENDIMIENTO DE GRANO EN HIBRIDOS DE MAIZ EN LA REGIÓN CIÉNEGA- BAJÍO MICHOACANO.

Pérez-Domínguez, J.F., Villareal-Rodas, J.H., y Flores-López, H.E.

INIFAP Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Av. Biodiversidad 2470. Tepatitlan de Morelos, Jal. C.P. 47600.

*Autor para correspondencia: perez.juanfrancisco@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

En Jalisco fueron evaluados seis híbridos comerciales de maíz contra el daño por gusano cogollero y la incidencia. Cada híbrido fue establecido en dos modalidades, con protección química contra plagas de follaje y sin protección. El objetivo fue analizar el daño causado por gusano cogollero a los híbridos de maíz, relacionándolo con la incidencia de pudrición del tallo (Fusarium subglutinans) y el rendimiento de grano. Los híbridos que tuvieron mayor nivel de daño por cogollero fueron: P-31G98, N83N5 y "Tigre". Los híbridos con menor daño por cogollero fueron: DK-2025, "Puma" y DK-2020. El híbrido P- 31G98 tuvo el menor porcentaje de plantas con pudrición de tallo, el que mayor pudrición de tallo tuvo fue "Tigre". Los híbridos con mayores rendimientos de grano fueron: DK-2025 y P-31G98, mientras que los que tuvieron más bajo rendimiento fueron: "Tigre", N83N5 y en algunas localidades el "Puma". El daño de cogollero a los híbridos no estuvo relacionado con el rendimiento de grano, pero entre porcentaje de plantas con pudrición de tallo si hubo una relación inversamente proporcional al rendimiento.

Palabras clave: *Zea mays*, gusano cogollero, daños.

BACTERIAS ENDÓFITAS DE MAÍZ BLANCO (*Zea mays* L.) COMO BIOINOCULANTES EN GERMINACIÓN DE SEMILLA.

[1]López-de-Nava, T., [1]Rodríguez-Mendoza, R., [1]Bañuelos-Amezcua, U. y [1,2*]Oceguera-Contreras, E.

1. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA.
2. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA.

*Autor para correspondencia: michelle_lopezdenava@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

RESUMEN

Las bacterias endófitas son capaces de promover el crecimiento de plantas por medio de diferentes vías, como: desarrollo de raíz e incremento en transferencia y asimilación de nutrientes y agua [1]. La forma de comunicación planta-bacteria endófita aún es desconocida, sin embargo, es una realidad que existe una estrecha simbiosis entre ambas [2]. En el presente trabajo se pretende observar el efecto de algunas bacterias endófitas aisladas de las semillas de maíz, que fueron seleccionadas por su capacidad de producir auxinas (fitohormona relacionada con el desarrollo radicular). Se analizaron las siguientes cepas: Ochrobactrum grignonense, O. gallinifaecis, Acinetobacter junii, Enterobacter asburiae, Bacillus spp., B. megaterium, B. cereus y Klebsiella pneumoniae, como bioinoculantes en la germinación de semilla de maíz blanco (Zea mays L.). En los ensayos realizados se muestra que las cepas O. grignonense, K. pneumoniae, y B. megaterium son potencialmente utilizables para el cultivo de maíz, ya que sus inoculaciones en las semillas resultan en plántulas vigorosas con amplio contenido de raíz y número de hojas y tamaño con respecto al cultivo control. Por otra parte, E. asburiae es una bacteria que inhibe parcialmente la germinación de semilla de maíz blanco. La genética propia de la semilla es un factor no controlable que puede tener un impacto tanto positivo como negativo en el desarrollo de la plántula. Por lo tanto, el mayor reto hasta el momento es encontrar a las bacterias endófitas que sean capaces, por medio de simbiosis diseñada, desarrollar plantas vigorosas y con buenos rendimientos bajo condiciones naturales de campo.

Palabras clave: maíz, bacterias endófitas, germinación, Ochrobactrum grignonense, Klebsiella pneumoniae, Bacillus megaterium, Enterobacter asburiae.

REFERENCIAS

[1] A. C. Ikeda et al., "Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes," Microb. Ecol., vol. 65, no. 1, pp. 154–160, 2013.

[2] L. Chiarini, A. Bevivino, C. Dalmastri, C. Nacamulli, and S. Tabacchioni, "Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots," Appl. Soil Ecol., vol. 8, no. 1, pp. 11–18, 1998.

[3]M. Lebuhn et al., "Taxonomic characterization of Ochrobactrum sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of Ochrobactrum tritici sp. nov. and Ochrobactrum grignonense sp. nov.," Int. J. Syst. Evol. Microbiol., vol. 50, no. 6, pp. 2207–2223, 2000.

USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL DISEÑO DE SIMBIOSIS Y LA FITOPATOLOGÍA DE CULTIVOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA.

*Beltrán-García, M.J., Macedo-Raygoza, G.R., Fonseca-Sepúlveda, C.U., Lew-Sánchez, B., y Martínez-Rodríguez, A.

Laboratorio 309, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

En nuestra investigación utilizamos bacterias endófitas para desarrollar biopesticidas y biofertilizantes. Sin embargo mas allá de la aplicación, queremos entender como ocurre la colonización (mecanismos) y descubrir aquellos metabolitos que se producen desde las primeras interacciones con la planta. Este estudio servirá para hacer un "diseño de simbiosis", que permitirá predecir el funcionamiento de los microorganismos en los cultivos. Usando espectrometría de masas MALDI-TOF y recientemente MALDI-Imagen en los últimos tres años hemos identificado 2000 bacterias endófitas transmitidas por semillas, así como aquellas aisladas de hojas, raíces y tallos de cultivos importantes. Estas bacterias a través de una huella ribosomal se identifican en minutos con una correlación del 100% comparados con el análisis del ADNr16S. Hemos descubierto que la perdida del equilibrio de las comunidades endófitas influyen en el desarrollo de enfermedades en el agave azul, también como ocurre la sucesión microbiana en la transición de semilla hasta plántulas de un agave silvestre. Recientemente se identifican los metabolitos que se generan post-inoculación de bacterias en el maíz. Así también usando espectrometría de masas observamos la transferencia de nitrógeno influido por la degradación de las bacterias por las plantas en condiciones de limitación de nutrientes y los mecanismos que ocurren.

Palabras clave: Biofertilizantes; Endófitos; MALDI-TOF; MALDI-Imagen.

REFERENCIAS

[1] América Martínez Rodríguez. Selección y dinámica de sucesión de bacterias endófitas transmitidas por las semillas y la micropropagación de plántulas de Agave marmorata Roezl para fines de restauración de un ecosistema. LICENCIATURA, BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA. Mayo de 2017.

[2] Cristobal Fonseca Sepulveda. Identificación de bacterias asociadas a la pudrición del cogollo de Agave tequilana por espectrometría de masas.

EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE AU Y AG EN RAÍCES DE BANANO Y SU PAPEL EN LA COLONIZACIÓN DE ENTEROBACTER CLOACAE ENDÓFITO DE BANANO.

[1]Macedo-Raygoza, G.M., [1]Valdez-Salas, B., [2]Cisneros-Reyes, C.I., y [2]Beltrán-García, M.J.

1 Instituto de ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, 21280-Mexicali, Baja California, México
2 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, 45129-Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: gmacedo@edu.uabc.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN
La industria de los nanomateriales, en especial las nanopartículas (NPs), tiene gran impacto ambiental, sin embargo, aún se desconoce como dichos materiales afectan a los organismos vivos, se cree que su efecto es debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y al estrés oxidativo1. Estudios han demostrado que NPs de Ag causan daño en lamembrana celular de raíces de diversos cultivos, así como elongación de raíz e inducción de genes relacionados con eventosde estrés oxidativo2, se ha observado que algunas plantas como Brassica juncea y Medicago sativa son capaces de tomardichas NPs dentro de sus tejidos3 lo que pudiera tener impacto en la agricultura al funcionar como vehículos para la inoculación de microorganismos de interés. Por otro lado, hay estudios donde se demuestran que las nanopartículas de Au no son tóxicas para los organismos vivos, principalmente para las bacterias que entran en contacto con ellas1, sin embargo, no hay muchos reportes de interacción de organismos vivos con dichas NPs. En este trabajo de investigación, mediante la técnica de tinción de DAB hemos encontrado un aumento en la acumulación de peróxido de hidrógeno en raíces de banano cuando estas entran en contacto con NPs de Au y Ag, previamente a ser inoculadas con Enterobacter cloacae un endófito de banano. De igual manera encontramos que las raíces inoculadas con E. cloacae, sin un tratamiento previo de NPs tardan hasta 2 meses para poder internalizar dichas bacterias, sin embargo, al tratarlas previamente con 2 condiciones de NPs (5 y 10% v/v), se puede observar células bacterianas dentro del tejido incluso después de 24 horas de inocular las plantas. Al hacer un tratamiento de extracción de endófitos, se encontró que hay bacterias inclusive en las hojas de las plantas tratadas provenientes de sistemas de micropropagación, se hizo una identificación bacteriana por medio de MALDI-TOF, pero E. cloacae solo se encontró a nivel de raíz, eso nos hace pensar que las NPs también son capaces de activar las bacterias que se encuentran como no cultivables dentro de las plantas.

REFERENCIAS

[1] V. Kumar-Mishra y A. Kumar, "Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting rhizobacteria", pp. 587-592, 2009.
[2] C. O. Dimkpa, "Can nanotechnology deliver the promised benefits without negatively impacting soil microbial life?", pp. 889-904, 2014.

[3] S. Dubchak, A. Ogar, J. W. Mietelski y K. Turnau, "Influence of silver and titanium nanoparticles on

IDENTIFICACIÓN POR MALDI-TOF DE *Streptomyces avidinii* AISLADO DE SUELOS DEL TUITO CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

*Fuentes-Medina, E., Guzmán-Rodriguez, O.D., Cruz-Adame, J.A. y Arroyo-Moreno, D.A.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, 45129-Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: elifnt@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Se realizó aislamientos de suelo del municipio del Tuito con el fin de obtener cepas de Streptomyces ya que estas bacterias son predominantes en suelos y se caracterizan por generar el olor a tierra mojada que es provocada por la Geosmina. Se utilizó el medio MYM que es selectivo para Streptomyces para poder aislar bacterias del suelo las cuales se hicieron por dilución y posteriormente se identificaron en un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF. Nueve cepas aisladas en total con caracteristicas de actinobacteria fueron identificadas. Se encontró una cepa que fue identificada como Streptomyces avidinii y con esta cepa se realizaron pruebas de inhibición a diferentes tiempos y con diferentes bacterias patógenas como Bacillus subtilis, Staphylococcus sp. Pseudomonas aeruginosa y Escherichia coli, las cuales fueron sensibles al producir halos de inhibición en todas las bacterias. Se presenta una estrategia novedosa para evaluar la capacidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ambientes naturales directamente a traves de la producción de metabolitos en cajas de petri, usando la colonia dsarrollada directamente en el agar, que fue sobrepuesta en una caja con el patógeno para medir los halos de inhibición. Este trabajo se realizó como proyecto de la clase Fisiologia y Bioquímica Microbiana conducida por el Dr. Miguel Beltrán García

Palabras clave: *Streptomyces avidinii*; suelo; MALDI-TOF.

REFERENCIAS

[1] Kharel, M., Shepherd, M, Bosserman, M., & Rohr, J. (2010). Isolation of Streptomyces Species from Soil . Current Protocols in Microbiology.

[2] Abebe, B., Feleke, M., & Berhanu, A. (2013). Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. Asian Pac J Trop Dis, 375- 381.

ENTEROBACTER CLOACAE Y KLEBSIELLA VARIICOLA ENDÓFITOS ANTAGONISTAS DE *Mycosphaerella fijiensis* Y BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO.

[1]Macedo-Raygoza, G.M., [1]Valdez-Salas, B., [2]Cisneros-Reyes, C.I., y [2]Beltrán-García, M.J.

1. Instituto de ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, 21280-Mexicali, Baja California, México.
2. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, 45129-Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: gmacedo@edu.uabc.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

La Sigatoka negra, causada por el hongo fitopatógeno Mycosphaerella fijiensis, es la principal enfermedad que afecta la producción de banano y es considerada la más cara y dañina alrededor del mundo1,2. Las pérdidas por esta plaga se estiman entre un 20-80% de la producción, actualmente el tratamiento de la enfermedad es mediante el uso de productos químicos. En estudios de nuestro laboratorio hemos encontrado que diversas cepas de este hongo toleran hasta 100 veces más de la concentración de los fungicidas que son aplicados en campo. Es por esto que se han buscado alternativas que sean más eficientes, el biocontrol es una opción prometedora, ya que hay reportes de cepas de Bacillus que suprimen los síntomas de la enfermedad hasta en un 42.9%3. En este trabajo de investigación se aislaron 2 bacterias endófitas de banano identificadas como Enterobacter cloacae y Klebsiella variicola que fueron probadas en contra de cepas de M. fijiensis y Fusarium oxysporum para determinar su actividad antifúngica en contra de dichos fitopatógenos, que resultaron en una inhibición de hasta un 100% para varias cepas de M. fijiensis y hasta un 16% para F. oxysporum. Además se realizaron pruebas para determinar sus propiedades agronómicas y se analizó si estas poseían la capacidad de sostener el crecimiento de plantas de banano en un sustrato bajo en nutrientes, y la habilidad de las mismas para transferir nitrógeno a la planta verificado mediante un marcaje de sus proteínas con 15N, con lo que se constató su capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y producir auxinas, fitohormona relacionada con el crecimiento de la planta; de igual forma, las mismas sostienen el crecimiento de plántulas de banano durante 2 meses cuando estas se encuentra en arena de playa aunado a su participación en la transferencia de nitrógeno al encontrar el marcaje de 15N en las hojas de los bananos inoculados.

Palabras clave: Endófito; Banano; *Mycosphaerella fijiensis*.

REFERENCIAS

[1] K. M. Chin; M. Wirz y D. Laird, "Sensitivity of Mycosphaerella fijiensis from banana to trifloxystrobin", pp.1264-1270, 2001.

[2] A.C.L. Churchill, "Mycosphaerella fijiensis, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control", pp.307-328, 2011.

BACILLUS CEREUS, BACILLUS SUBTILIS Y OCHROBACTRUM GALLINIFAENCIS. ENDÓFITOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE EMBRIONES DE MAÍZ: ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN DEL SUSTRATO.

Guzmán-Claustro, T.M., Lew-Sánchez, B., Macedo-Raygoza, G.M., Beltrán-García, M.J.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, 45129-Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: jbeltran@edu.uag.mx

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Por mucho tiempo se ha investigado cual es la relación que mantienen las bacterias y las plantas; descubriendo una interacción muy estrecha en sus raíces, superficie de las hojas, tallo e incluso en los tejidos vasculares y dentro de las células. A este tipo de bacterias las llamamos endófitas, y pueden ofrecer a las plantas un aumento de la disponibilidad de nutrientes y protección para algunas enfermedades, a cambio, estas reciben un lugar donde colonizar. Este proyecto estudia cómo los endófitos influyen en el desarrollo de plántulas derivadas de embriones de maíz en un lapso determinado de tiempo. Además, se analizó las relaciones que mantienen las bacterias agregadas a las plantas y los endófitos de los embriones. En cuanto las bacterias utilizadas en este experimento se han seleccionado por su gran capacidad de colonización y buenas promotoras de crecimiento en las plantas de maíz. En particular, Bacillus cereus por encontrarse en las hojas, Bacillus subtilis y Ochrobactrum gallinifaencis al estar en las semillas. Para analizar el efecto de las bacterias se tomó muestra del suelo a los 5 y 10 días inoculándola en caldo de soya tripticaseína, después las bacterias se recuperaron y se identificaron por medio de MALDI-Tof. También se estudió el efecto directo en las plantas, su crecimiento y desarrollo de hoja. Cabe mencionar que con esta serie de experimentos se propone la idea de la formación de un microambiente entre todas las bacterias endófitas, las bacterias aplicadas y las plantas, influyendo en el desarrollo.

Palabras clave:

REFERENCIAS

[1] M. N. R. D. Johnston-Monje, «Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in Zea across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology,» PLoS ONE, vol. 6, nº 6, p. 22, 2011.

[2] M. Madigan, "Simbiosis Microbianas [1]". in Brock. Microbiología de los microorganismos, J.M Martiniko, K.S. Bender, D.H. Buckley, D. A. Stahl: Pearson: Madrid, 2015 (727 pp.)

IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF, SECUENCIACIÓN DE ARNR 16S Y PRUEBAS AGRONÓMICAS DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE SEMILLA DEL *Agave tequilana*.

Zaizar-Castañeda, I.A., Gutierrez-Santa, A.A, Flores-Delgadillo, O., Guzmán-Rodriguez, D., Macedo-Raygoza, G.M., Peralta-Mendoza, J., Huerta-Robles, A.X., y Beltrán-García, M.J.

1. Departamento de Química-ICET Universidad Autónoma de Guadalajara.
2. Instituto de Ingenierías, Universidad Autónoma de Baja California.

*Autor para correspondencia: itzel_iazc97@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

El Agave es el género de la familia agavácea con aproximadamente 200 especies, de las que 150 se encuentran en México. De estas, el Agave tequilana Weber es la especie con mayor importancia económica en México, esto debido a la demanda mundial del Tequila. Es por ello que es de interés mantener un control sobre sus cultivos y conocer más profundamente sus características biológicas y la interacción con microorganismos para poder implementar métodos de optimización o incluso la producción de nuevos productos. La finalidad de este trabajo es la contribución a la investigación para determinar el microbioma de las semillas de diversos agaves. La información obtenida en este estudio es únicamente respecto al A. tequilana weber. Se aislaron cepas bacterianas provenientes de las semillas, las cuales fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación de ARNr 16S, para una mayor exactitud. Además se realizaron ensayos para la caracterización de propiedades agronómicas como son la fijación de nitrógeno, producción de auxinas, solubilización de fosfatos y producción de ACC deaminasa, para determinar cuáles son las bacterias que posiblemente aportan beneficios a la planta y con esto continuar su estudio de manera más específica según sus características. En total se aislaron 139 cepas bacterianas donde predomina el género Bacillus. Del total de cepas un 68% producen auxinas, 86% fijan nitrógeno, 44% solubilizan fosfatos y 73% producen ACC deaminasa.

Palabras clave: endófitos; bacteria; agave tequilana weber.

REFERENCIAS

[1] BeltranGarcia, M. J., White Jr, J. F., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Torres, M. S.& Di Mascio, P. (2014). Nitrogen acquisition in Agave tequilana from degradation of endophytic bacteria. Scientific reports, 4.

[2] Rocha, P. J. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. Revista Palmas, 23(3), 9-17.

BACTERIAS ENDÓFITAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ COMO UN INSUMO BIOLÓGICO PARA MEJORAR EL USO EFICIENTE DE NUTRIENTES Y COMPRENDER LAS RELACIONES CON LA PLANTA BAJO UN ACERCAMIENTO DE PCR TIEMPO REAL.

[1]Lew-Sánchez, B.E.,[1]Echaide-Aquino, F., [2]Huerta-Robles, A.X., y [1]Beltrán-Garcia, M.J.

1. Chemistry Department, Laboratory of biochemistry and Molecular biology, Universidad Autónoma de Guadalajara, 45129-Zapopan, Jalisco, México.

2. Dpto of chemistry engineering, Engineering Institute, Autonomous University of Baja California, 21280-Mexicali, Baja California, México.

*Autor para correspondencia: brigitte_84n@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

En México, el maíz es uno de los tres cultivos agrícolas más importantes. Por esta razón, para obtener rendimientos aceptables del maíz, los productores se han visto obligados a exigir cantidades significativas de fertilizantes químicos, lo que provoca que las plantas sean más susceptibles a las enfermedades; sin embargo, su alto costo afecta negativamente sus insumos. Los microorganismos endófitos se encuentran en cada una de las 300.000 especies de plantas en la tierra. Estos organismos residen en los tejidos vivos de la planta huésped sin causar síntomas de enfermedad haciendo así con una variedad de relaciones simbióticas[1] phytostimulation [2] biofertilization [3]; and control of pathogens [4]. El proyecto que se desarrolla en el laboratorio busca atreves del diseño de simbiosis, aumentar la productividad del cultivo usando microorganismos endófitos benéficos de las semillas de maíz para el desarrollo de bio-formulaciones que disminuyan el uso de fertilizantes nitrogenados con un acercamiento más específico a metabolitos secundarios medidos por medio de las técnicas Q-PCR y Espectrometría de masas MALDI-IMAGING.

Palabras clave: Endófito; Banano; *Mycosphaerella fijiensis*.

REFERENCIAS

[1] F. Ibañez, D. S. Ferrara, and Z. M. Oliveira, "Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances," pp. 409–417, 2012.

[2] L. Vargas, T. Louise, G. De Carvalho, and A. S. Hemerly, "Early responses of rice (Oryza sativa L .) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes," pp. 127–137, 2012.

[3] B. R. Lopez, C. Tinoco-ojanguren, M. Bacilio, A. Mendoza, and Y. Bashan, "Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus Mammillaria fraileana affect.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE *Agave angustifolia*.

Villaseñor-Sánchez, A.S., Flores-Delgadillo, O.J., Martínez-Rodríguez, A., Beltrán-García, M.J.

Universidad Autónoma de Guadalajara, Departamento de química – ICET, Laboratorio 309, Av. Patria 1201.

*Autor para correspondencia: sofia.villasan@outlook.es

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

RESUMEN

Las bacterias endófitas transmitidas por las semillas han atraído la atención por las propiedades que ejercen sobre la implantación de las plantulas en sus ambientes. Estas ayudan a la planta desde la germinación. La pérdida de estas bacterias provoca que las plantas no se desarrollen y mueran. Este trabajo es parte de un proyecto que busca conocer la ecología microbiana en especies de Agave silvestre, entre estas A. angustifolia. Por otra parte, se busca conocer si existe una relación mutualista con la planta. Esto significa que estas bacterias pueden ser utilizadas como biofertilizantes en la industria agronómica. Bacterias previamente aisladas por Jorge Peralta, fueron activadas desde viales de conservación para valorar la pureza del cultivo. Se sembraron en Agar de Soya Tripcaseina (AST). Una vez obtenido el cultivo puro, se extrajeron las proteínas de cada una de las bacterias mediante un protocolo especial para ser identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF. La identificación de microorganismos a través de MALDI-TOF es una técnica muy buena, la cual obtiene un espectro propio de un microorganismo (huella proteíca) que es comparado con bases de datos como la MALDI BIOTYPER de Bruker. En un análisis de 30 aislados, se encontró que los microorganismos estaban contaminados con dos o tres bacterias diferentes a las previamente reportadas. Se han analizado 10 viales de los cuales se han obtenido hasta 30 bacterias. Las bacterias con mayor score (superior a 1.90) de MALDI TOF fueron: Bacillus simplex, Micrococcus luteus, B. Pumilus, Brevibacillus megaterium, Alcaligenes faecalis, B. Safensis. Estas cepas seran secuenciadas para su posterior registro en el genbank del NCBI.

Palabras claves: Endófitas; Agave; MALDI-TOF; germinación.

REFERENCIAS

[1] Truyens et al., 2015
[2] Beltran-Garcia et al., 2014
[3] Johnston-Monje et al., 2011

DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE p-ANISIDINA EN ORGANOGELES.

[1]*López-Martínez, L.A., [2]Guerrero-Nájera, Z.A., [1]Martínez-Juárez, L.G., [2]Álvarez-Salas, C., [2]Perez-Martínez, J.D., [3]López-Pablos, A.L., y [3]Saavedra-Leos, M.Z.

1. Coordinación Académica Región Altiplano Oeste, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Carretera– Santo Domingo #200, Tel: (496) 96-3-40-30, C.P. 78600, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México.
2. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Dr. Manuel Nava # 8, Zona Universitaria Poniente C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P, México.
3. Cordinación Académica Región Altiplano, Universidad Autónoma de San Luis Potosí Carretera a Cedral km. 5+600, C.P. 78700 Matehuala, San Luis Potosí, México.

*Autor para correspondencia: araceli.lopez@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN
Los organogeles elaborados a partir de etil celulosa y monoglicerido, son una excelente alternativa para evitar el uso de grasas con altos contenidos de grasas saturadas y *trans*. Para elaborar estos organogeles, la etil celulosa tiene que ser soluble en el aceite y esto se logra con temperaturas de entre 140°C y 160°C, para sobrepasar la temperatura de transición vítrea del polímero. Por las altas temperaturas a las que se lleva el aceite muy probablemente se presentará oxidación de la grasa. Actualmente no se ha estandarizado un método adecuado para medir la oxidación en estos novedosos sistemas. En base a la problemática anterior, en esta investigación se desarrolló la metodología para medir los valores de p-anisidina en organogeles. Los valores de p-anisidina se utilizan para evaluar los procesos de oxidación secundaria de la grasa. Esto con el fin de conocer el grado de oxidación del sistema y evaluar si a estos organogeles, se les puede dar alguna aplicación práctica, sin generar ningún riesgo para la salud, o poder buscar alternativas para evitar la oxidación.

Palabras clave: Organogeles; p-anisidina; oxidación

INTRODUCCIÓN

Dietas que incluyen ácidos grasos *trans* ocasionan un incremento en el nivel de colesterol sanguíneo y por lo tanto ocasionan un aumento en el riesgo de sufrir enfermedades coronarias. Adicionalmente, hay evidencia de que la ingesta de ácidos grasos *trans* predispone a la expresión de la diabetes tipo II (Ascherio y col., 1999; Sameron y col., 2001). Sobre esta base, la tendencia actual de la industria alimentaria, es buscar alternativas que mantengan la competitividad tecnológica sin el uso de aceites/grasas parcialmente hidrogenados. Una alternativa a este respecto son los organogeles ó estructuras supramoleculares estabilizadas por fuerzas de corto alcance. Las estructuras supramoleculares se forman a partir de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que pueden ser tanto lipofílicos como ambifáticos (Jing-Liang Li J y Xiang-Yang Liu, 2010). Algunos compuestos ambifáticos, enfocándose en este caso a los monoacilglicéridos (MAGS), se utilizan para estructurar aceites vegetales mediante el desarrollo de mesofases. Sin embargo los geles que se forman son débiles,

pero cuando se añade etil celulosa a estos sistemas, los monogliceridos actúan como plastificantes (Dey y col., 2011). Las moléculas ambifáticas se incrustan entre las cadenas de polímero, limitando la formación de zonas de unión entre las cadenas del polímero, y de esta manera se mejoran las propiedades viscoelásticas del organogel. Sin embargo las altas temperaturas que se utilizan para formar estos geles pueden oxidar de manera significativa el gel. Los productos formados durante la oxidación del producto producen sabores indeseables y se relacionan con efectos adversos hacia la salud (Jacobsen y col., 2015). En base a esto es importante conocer el grado de oxidación de los geles. A pesar de que el índice de peróxido es una medida corriente de la oxidación de los lípidos, su uso está limitado a las etapas iniciales de oxidación. Sin embargo los peróxidos pueden sufrir descomposiciones posteriores. Por eso se considera que el índice de p-anisidina, es una medida complementaria del grado de oxidación ya que mide los procesos de oxidación secundaria de la grasa. Con estas dos técnicas se puede obtener la historia oxidativa completa del sistema (Tompkinsa y Perkinsb., 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de organogeles

Aceite vegetal Oleico (92%) se elevó a una temperatura de 140°C posteriormente, se adiciono 4% de etli celulosa, se dejó reposar durante 30 minutos posteriormente se añadió 4% de monoglicérido, se bajó la temperatura a 80°C y se llevó a refrigeración hasta obtener una consistencia sólida. Para proteger de la oxidación a los organogeles se probó la adición del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT). Se añadió en proporciones de 1% (que se disminuyó de la cantidad de aceite inicial). El antioxidante se adiciono al inicio junto con la etil celulosa.

Valor de P- anisidina

Los compuestos primarios de oxidación se evaluaron en organogeles y a manera comparativa en aceites durante una semana. Este es un método colorimétrico, basado en el desarrollo de color que resulta de la reacción entre el reactivo de p-anisidina y los compuestos secundarios de la oxidación (cetonas, alcoholes y ácidos y principalmente aldehídos) (Tompkins y Perkins, 1999). Para el caso de los aceites, se pesaron 0.5 gr de muestra en un matraz volumétrico de 25 ml, se aforó con isooctano y se midió la absorbancia a 350 nm en celdas de 1 cm en un espectrofotómetro Spectronic Unicam Acuamate, Inglaterra, usando isooctano puro como blanco para ajustar a cero. Se tomaron 5 ml de la solución de la muestra con el isooctano en un tubo de ensaye y se le añadió exactamente 1 ml del agente p- anisisdina al 25% en ácido acético glacial y se agito por 10 seg. en un agitador vortex después de exactamente 10 min se midió la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro tomando de blanco isooctano puro que reacciono con la p-anisidina.

$$V.\ P\text{-}A = \frac{25^{*}\ (1.2\ AS - AB)}{M}$$

Donde:

AS = absorbancia de la solución aceitosa después de la reacción con el reactivo p- anisidina.

AB = Absorbancia de la solución de aceite.

M = peso de la muestra

Para poder realizar la técnica se tuvo que estandarizar la manera en que se rompe la matriz del gel y de esta manera poder extraer el aceite y obtener las absorbancias necesarias para calcular los índices de p-

anisidina. Los organogeles se disolvieron en isooctano se filtraron y posteriormente la fase de aceite se analizó como mencionamos anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el control de calidad de aceites y grasas es muy común la determinación del índice de Peróxido, Anisidina, TOTOX, entre otras (Barrera-Arellano., 1997). Sin embargo la determinación de estos parámetros, específicamente en organogeles se dificulta, ya que estos son sistemas estructurales complejos. En esta investigación se determinó el contenido de p-anisidina en organogeles con y sin antioxidante (BHT). Para evaluar la confiabilidad de los resultados se compararon con los valores de p-anisidina de aceite evaluados bajo condiciones similares.

El valor de p-anisidina en el aceite a temperatura ambiente fue entre 3.2 y 5 mmol/kg (Tabla 1). Sin embargo cuando el aceite se calentó a 140°C y se dejó en esta temperatura por 30 min., el valor de p-anisidina se incrementó en gran medida entre 9 y 10.6 mmol/kg, esto era de esperarse por las altas temperaturas. Sin embargo cuando se añade el antioxidante si se logra prevenir la oxidación, se tienen valores aproximados de 7 mmol/kg en todos los tiempos.

Tabla 1. Valor de p-anisidina en Aceites mmol/kg

Tratamiento	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
1	3.2 ± 0.25	4.4±0.15	3.9 ±0.18	5.00 ±0.02
2	9.1 ±1.21	10.1 ± 0.18	10.08 ± 0.04	10.6 +0.5
3	7.08+0.14	7.19±0.12	7.3±0.1	7.12±0.20

*1 aceite a t ambiente; 2 aceite a 140°C por 30 min; 3 aceite + BHT

Posteriormente se evaluó el grado de oxidación de organogeles elaborados a partir de etil celulosa y monogliceridos y además cuando se les añadio el antioxidante BHT, los resultados se muestran en la tabla 2. Como se puede observar el valor de p-anisidina en el organogel sin antioxidante es muy alto, debido a que la grasa está muy oxidada, sin embargo el BHT logro proteger de a los organogeles de la formación de compuestos secundarios de oxidación.

Tabla 2. Valor de p-anisidina en Organogeles

Tratamiento	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
1	20.1 ± 0.21	18.2±0.04	21.3±0.15	23.2±0.1
2	7.43±0.12	8.25± 0.12	8.1±0.03	8.21±0.12

*1 Organogel; 2 Organogel con BHT

Algunos investigadores mencionan que la oxidación producida por los ácidos grasos del aceite se detiene parcialmente al estar atrapado en la red formada por el monoglicérido y la etil celulosa (Da Pieve y col. 2011). En esta investigación el contenido de compuestos de oxidación secundaria en el aceite y en el organogel fue similar, la red formada por las moléculas estructurantes no protegió en mayor medida de la oxidación que al aceite. Concretamente no se sabe el comportamiento de oxidación de los organogeles, falta mucho estudio como utilizar otros antioxidantes para evaluar realmente como es el comportamiento de oxidación en estos sistemas.

CONCLUSIONES

El BHT resulto un antioxidante efectivo en la protección contra compuestos de oxidación secundaria en aceite a 140°C y en organogeles elaborados con etil celulosa y monoglicerido. Existe muy poca investigación de la oxidación en organogeles a pesar de las importantes características viscoelásticas de estos sistemas como alternativa para el uso de grasas saturadas y grasas *trans*, este estudio muestra resultados muy interesantes, sin embargo para tener mayor información del comportamiento de oxidación de estos sistemas hace falta mucha investigación como probar otros tipos de antioxidantes

Los autores agradecen al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP- SEP) por el apoyo a la incorporación de nuevos profesores de tiempo completo DSA/103.5/16/10419, con el cual fue posible realizar el proyecto.

REFERENCIAS

[1] Ascherio A., M.J. Stampfer, W.C. Willett, *Trans* fatty acids and coronary heart disease, http://www.hsph.harvard.edu/reviews/transfats.pdf (1999).

[2] Da Pieve S., Calligaris S., Co E., Nicoli M.C., Marangoni A.G. (2010). Shear Nanostructuring of Monogliceride Organogels. 5:211-217.

[3] Dey, T., Kim, D.A., Marangoni, A.G. (2011). Ethylcellulose Oleogels. In A. Marangoni and N. Garti (Eds.), *Edible Oleogels. Structure and Health Implications* (pp. 295-311). AOCS Press, Urbana, IL.

[4] Jacobsen, C. Some strategies for the stabilization of long chain n-3 PUFA-enriched foods: A review. Eur J Lipid Sci Technol. 2015, 117, 1853-1866.Jing-Liang L., Bing Y., Xiang-Yang [5] L., Hong-Yao X. (2010). Microengineering of Supramolecular Soft Materials by Desing of the Crystalline Fiber Networs. *Crystal growth and design*. 10: 2699-2706.

[6] Salmeron J., Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Colditz G.A., Rimm E.B., Willett W.C. (2001). Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am. J. Clin. Nut.* 73 (6):1019-26.

[7] Tompkinsa C., Perkinsb E. G. 1999. The Evaluation of Frying Oils with the p-Anisidine Value. *JAOCS*, Vol. 76(8): 945-947.

COMPOSICIÓN FENÓLICA, CONTENIDO DE VITAMINA C Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE *Condalia ericoides*.

*[1]Pinedo-Serrano, E., [1]Contreras-Ovalle, N.I., [1]Torres-García, B.E., [2]Guzmán-Maldonado, S.H.

1. Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica de Zacatecas. Fresnillo, Zacatecas, México, 99059.
2. Laboratorio de Alimentos Funcionales del Campo Experimental Bajío INIFAP. Celaya, Guanajuato, México, 38110.

*Autor para correspondencia: elihu_pse@hotmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

ABSTRACT

Condalia is a genus that belongs to the *Rhamnaceae* family with 12 species described, *C. ericoides* is distributed in Mexico (Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo Leon, San Luis Potosi and Zacatecas) and in the United States (Arizona, New Mexico and Texas). People consume the fresh fruit when is purple in color. Wild fruit was harvested from shrubs and were separated by color into three different bulks, yellow, red, and dark purple. It was analyzed total phenols, condensed tannins, total anthocyanins, flavonoids and simple phenols by HPLC-DAD. Vitamin C and DPPH, TEAC and ORAC antioxidant capacity was assessed as well. Extractable phenols and condensed tannin were low in dark purple fruit; meanwhile, total anthocyanins and total flavonoids in dark purple fruit were 57.6 and 16.5% higher, compared to those of yellow fruit. Gallic and benzoic acids were identified as well as epigallocatechin-3 gallate and epicatechin in all samples. It was evident the higher content of epigallocatechin-3 gallate in *C. ericoides* fruit compared to other commonly consumed fruits. Vitamin C contents in dark purple fruit (447.3 mg/100 g DW) the fruit content was notorious in comparison to what was reported for acerola (*Malphigia emarginata* DC.) seed flour (457.3 mg/100 g DW), a fruit known for its high content of vitamin C. ORAC activity was not different by fruit color and in average, was 50% higher than that of cranberries. DPPH and TEAC antioxidant activities of *C. ericoides* were low in dark purple fruit; however, *C. ericoides* showed higher DPPH and TEAC activities regarding to pomegranate, blueberry and cranberry, among other fruits. *C. ericoides* fruit could be considered as a functional fruit by their chemical properties. This information could attract the interest for the species in order to cultivate, increase fruit consumption and generate industrialized products as it was seeing with another wild species of fruit.

Keywords: *C. ericoides*; phenolic compounds; antioxidant; TEAC; ORAC; DPPH.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos poseen una actividad antioxidante destacada, disminuyendo el daño ocasionado por lo radicales libres en el metabolismo previniendo el estrés oxidativo. Hay una importante fuente de compuestos fenólicos en la dieta de la población mexicana, ya que se consumen productos como la cebolla, ajo, brócoli, uvas, jitomates, calabaza, chiles, frijoles negros, frijoles pintos entre otros, que son fuentes naturales de compuestos fenólicos y sus derivados.

El garambullo zacatecano (*Condalia ericoides*) nombrado así por los habitantes de la región de Fresnillo, Zacatecas, México, es un arbusto silvestre pequeño de 0.3 a 1 metro de alto y 1.5 metros de ancho. Se han podido observar algunos arbustos de forma nativa, en latitud +23° 21' 55.27" y longitud -102° 52' 9.84" del estado de Zacatecas que corresponde a las localidades de Fresnillo. Sus frutos son color negro púrpura cuando están completamente maduros, de 7.12 mm de largo, con 1 a 2 semillas, y se dan en las temporadas de agosto y septiembre. Son consumidos por los habitantes de las localidades cercanas. Desde el punto de vista químico y nutricional, los frutos de la especie *Condalia ericoides* tienen un potencial desconocido. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar algunos compuestos fenólicos de interés tales como antocianinas, fenoles totales, taninos condensados y flavonoides totales en la frutilla del garambullo zacatecano. También determinar la vitamina C y los fenoles simples por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Así como evaluar la capacidad antioxidante a través de los análisis de TEAC, ORAC, DPPH y FRAP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y Almacenamiento del Material Vegetal.

Se colectó el material tomando en cuenta un muestreo adaptativo por grupos de acuerdo con Wong *et al*. (2001) [1]. Tomando en cuenta tres estados de madurez diferente, los cuales están basados en el color que presenta el fruto, siendo amarillo, rojo y morado. Los frutos fueron liofilizados y almacenados hasta el momento de su análisis a -20°C protegidos de la luz y humedad. Las condiciones de trabajo fueron bajo luminosidad reducida.

Fitoquímicos Funcionales.

En los tres estados de madurez, se cuantificaron los fenoles totales [2], taninos condensados [3], flavonoides totales [4], antocianinas totales [5]. Así como los fenólicos simples [6] y vitamina C [7] por cromatografía líquida de alta resolución. A su vez, se determinó la capacidad antioxidante de los fitoquímicos funcionales por los métodos de DPPH [8], FRAP [9], TEAC [10] y ORAC [11].

Análisis Estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor completamente al azar, y se empleó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, para determinar las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Se empleó el programa Minitab 16.1.0 Statistical Software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles Totales

El mayor contenido de fenoles totales se observó en los frutos amarillos y rojos con 6552.7 ± 185.1 mg EAG/100 g BS, y 6350.8 ± 245.2 mg EAG/100 g BS, respectivamente y el morado obtuvo la menor cantidad con 5740.4 ± 300.5 mg EAG/100 g BS. Presentándose diferencias significativas de los frutos amarillo y rojo respecto al morado. La disminución de estos compuestos puede ser debido a que, al madurar el fruto, se llevan a cabo reacciones de polimerización, formando otro tipo de compuestos [12], o bien, debido a la acción de enzimas como la polifenol oxidasa que suele estar presente en estos estados inmaduros [13]. Respecto a la cantidad de fenoles totales en frutos comerciales se encontró que el fruto maduro de *Condalia ericoides* sobrepasa al arándano de la variedad Elliot, frambuesa, zarzamora y ciruela negra con cáscara con 2048, 822, 1637 y 1689 mg EAG/100g BS respectivamente [14]. De igual manera ocurre para lo reportado en el arándano variedad O´Neal con 2137 mg EAG/100 g BS [15].

Taninos Condensados

Se presentó un patrón similar al de fenoles totales en la cuantificación de taninos condensados, donde el fruto amarillo presentó la mayor cantidad (7075.6 ± 76.9 mg E(+)-C/100 g BS), seguido del rojo (3620.7 ± 45.4 mg E(+)-C/100 g BS) y el morado (1469.3 ± 112.8 mg E(+)-C/100g BS). Se encontró que los resultados de los tres estados de madurez analizados son significativamente diferentes entre sí. Estos tienden a disminuir por posibles mecanismos enzimáticos de hidrólisis que dan lugar a compuestos menos complejos como fenoles simples [16]. También puede deberse a que una gran cantidad de los taninos condensados en estados inmaduros son dirigidos hacia la síntesis de antocianinas debido a la acción de las enzimas antocianin-sintasa (AS) y 3-glicosil transferasa (3GT) [13]. Zarei *et al*. (2011) [13] reporta que la cantidad de taninos condensados en la granada (*Punica granatum* L.) disminuye conforme madura el fruto de forma similar al membrillo cimarrón (*Malacomeles denticulata*).

Antocianinas Totales

Se obtuvo el mayor contenido de antocianinas en el fruto morado (914.1 ± 33.9 mg C3G/100 g BS) seguido del rojo (772.7 ± 68.3 mg C3G/100 g BS) y la menor cantidad en el amarillo (387.3 ± 28.5 mg C3G/100 g BS), existiendo diferencias significativas entre los tres estados de madurez. El comportamiento presentado en los frutos de *Condalia ericoides* es común en frutos rojos; de acuerdo a lo reportado por Zhao en el 2007 [17], en la frambuesa son más altas las antocianinas en estados maduros, este cambio es acompañado de una disminución en la concentración de fenoles totales. En el arándano, Ribera *et al*. (2010) [18] menciona que en un estado inmaduro no hay presencia de antocianinas, en estados intermedios existen bajas concentraciones y en estados maduros se cuantifican las mayores concentraciones. En este trabajo, se observó que el fruto maduro de *Condalia ericoides* sobrepasa al arándano variedad O´Neal que presenta 472 mg C3G/100 g BS [15]. Sin embargo, es menor a lo reportado para la zarzamora (*Rubus adenotrichus*) de 1230 mg C3G/100 g BS [19].

Flavonoides Totales

El mayor contenido de flavonoides totales se obtuvo en los frutos morados y rojos, con 569.5 ± 49.9 mg E(+)-C/100 g BS y 567.5 ± 9.9 mg E(+)-C/100 g BS, respectivamente, y la menor cantidad en los frutos amarillos con 481.2 ± 34 mg E(+)-C/100 g BS. Los frutos morados y rojos no mostraron diferencias significativas de acuerdo al contenido de flavonoides, sin embargo, estos dos últimos sí son diferentes a los amarillos. El hecho que se presente la mayor cantidad de flavonoides en el estado maduro, es debido a que estos forman parte de varias antocianinas [20]. En datos reportados por Mahmood *et al*. (2013) [21] para la cereza, se muestra una conducta similar de aumento de flavonoides conforme madura el fruto, en el estado inmaduro 36.61 mg E(+)-C/100 g BS, semimaduro 47.36 mg E(+)-C/100 g BS y en maduro 51.80 mg E(+)-C/100 g BS.

Fenólicos simples

Se encontraron en el fruto: ácido gálico, EGCG (epigalocatequina-3-galato), epicatequina y ácido benzóico. En el fruto amarillo se presentaron el EGCG y ácido benzóico con 1861.71 y 630.34 mg/100g BS respectivamente. En el rojo se encontraron el ácido gálico, EGCG, epicatequina y ácido benzoico con 106.49, 1987.32, 515.54, 458.38 mg/100g BS respectivamente. Y en el morado fue encontrada la epicatequina con 4788.05 mg/100g BS. Respecto al contenido de epicatequina detectada en el estado maduro del fruto, estudios realizados en la uva morada variedad Vranac [22], demuestran concentraciones de epicatequina de 1.8 y 745 mg/100 g BS en la cáscara y semilla respectivamente. La

cuantificación de epicatequina en las semillas de cocoa (*Theobroma cacao* L.), arroja resultados desde 270 a 1235 mg/100 g en BS [23].

Vitamina C

Para el contenido de vitamina C, se cuantificó el ácido ascórbico y dehidroascórbico (vitamina C total). Para el fruto amarillo se encontró 183 mg/100 g en BS de ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico en 300 mg/100 g BS. El fruto rojo arrojó 160 mg/100 g BS de ácido ascórbico y el dehidroascórbico no es detectado. En la fruta morada el ácido ascórbico detectado (447.3 mg/100 g BS), fue muy similar en contenido al de la semilla de acerola (*Malphigia emarginata* DC.) (457.3 mg/100 g BS) [24], reconocida como buena fuente de esta vitamina. A pesar de que el fruto de *Condalia ericoides* no es superior a la cantidad anteriormente mencionada, se observa que se posee cantidades considerables de vitamina C.

Capacidad Antioxidante FRAP

La mayor capacidad antioxidante fue encontrada en el fruto amarillo seguida del morado y por último el rojo con contenidos de 35.9 ± 2.9, 34.5 ± 1.8 y 31.9 ±2.3 mmol ET/100 g BS respectivamente. El fruto morado no muestra diferencias significativas en su capacidad antioxidante con respecto a los frutos amarillo y rojo, sin embargo, estos dos últimos frutos son significativamente diferentes entre sí. Comportamientos similares donde la mayor capacidad antioxidante se da en frutos inmaduros se han reportado por Gibson *et al*. (2013) [25] para el arándano lowbush, siendo los estados verde, rojo y azul con 302, 151 y 125 mg ET/g BS respectivamente. El fruto maduro de *Condalia ericoides*, presenta una alta capacidad antioxidante por FRAP, comparada con frutos comerciales reportados por Henríquez *et al*. (2011) [26], observándose que supera a la blueberry variedad Duke, zarzamora variedad Cherokee, frambuesa variedad Heritage y fresa variedad Camarosa con 19.8, 25.6, 16.4 y 21.9 mmol ET/100 g BS respectivamente, sin embargo, no logra superar la capacidad antioxidante que presenta la cáscara de manzana variedad Delicious reportada por este mismo autor con 75.9 mmol ET/100 g BS.

Capacidad Antioxidante por DPPH

La mayor capacidad antioxidante se encontró en el fruto amarillo, seguida del rojo y por último el morado, con 32.96 ± 0.94, 32.18 ± 2.43 y 27.70 ± 1.56 µmol ET/100 g BS respectivamente. Se observó que no existen diferencias significativas entre los frutos amarillo y rojo, sin embargo estos dos sí presentan diferencias significativas respecto al fruto morado. Ha sido reportado que en concentrados de jugos de granada variedad Bhagwa en distintas etapas de madurez por Fawole y Opara (2013) [27], la capacidad antioxidante conforme el fruto llega a su estado de madurez disminuye arriba del 42%, a pesar de presentar aumento de las antocianinas a lo largo de la maduración. Por lo que los autores atribuyen el decaimiento de la capacidad antioxidante a la disminución de fenoles totales y galotaninos en el periodo de maduración.

Capacidad Antioxidante por TEAC

Se presentó más elevada en el fruto amarillo, seguida del rojo y por último el morado con 759.7 ± 26.7, 681.9 ± 28.9 y 589.8 ± 52 µmol ET/g BS respectivamente. Se observó que el fruto amarillo y rojo no presentaron diferencias significativas entre sí, sin embargo, estos dos frutos fueron significativamente diferentes al fruto morado. El arándano variedad Pilgrim evaluado en cuatro estados de madurez [28], presenta mayor capacidad antioxidante durante los periodos inmaduros y muestra un decaimiento de la misma conforme el fruto madura. De igual manera datos reportados por Preedy (2014) [20] para fresa (*Fragaria ananassa*) y zarzamora (*Rubus fructicosus*) muestran elevada capacidad antioxidante en

estados inmaduros a pesar de que en estados maduros del fruto el contenido de antocianinas se eleva. En estudios publicados para el arándano variedad Brighwell, zarzamora variedad Hull (thornless) y fresa variedad Toyonaka mostraron capacidades antioxidantes de 149.8, 114.8 y 44.4 µmol ET/g BS respectivamente [29]. La frambuesa variedad Newburgh presentó 98 µmol ET/g BS [30].

Capacidad Antioxidante por ORAC

Se encontró para el fruto morado 67417.5 ± 4991 µmol ET/100 g BS, el amarillo con 65326.1 ± 5274 µmol ET/100 g BS y para el rojo con 60473.3 ± 5447 µmol ET/100 g BS. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los frutos, siendo estos estadísticamente iguales en cuanto a capacidad antioxidante por el método ORAC. Datos recopilados por Ramadane y Mohan (2004) [31] han comprobado una alta correlación de fenoles totales con el ensayo ORAC, de igual manera compuestos encontrados en estas etapas de madurez como el EGCG y algunas catequinas tienen gran actividad antioxidante contra especies reactivas del oxígeno [20]. En el caso del fruto morado, este posee grandes cantidades de antocianinas totales, las cuales poseen la capacidad de inhibir en gran medida los radicales peroxilo e inducir la apoptosis de células cancerosas [32]. Además, las grandes concentraciones de vitamina C encontradas en esta etapa del fruto permiten que aumente la actividad antioxidante ya que este compuesto logra eliminar las especies reactivas de oxígeno que causan estrés oxidativo [33]. Se han reportado capacidades antioxidantes de 34329 µmol ET/100 g BS para el arándano de variedad Elliot, para la frambuesa 14924 µmol ET/100 g BS y para la ciruela negra con 52417 µmol ET/100 g BS [14].

CONCLUSIONES

Los frutos de *Condalia ericoides* presentan un contenido sobresaliente de compuestos fenólicos, siendo una rica fuente de antocianinas y flavonoides. El fruto maduro es una fuente importante de epicatequina y vitamina C. En comparación con otras frutas, se presenta una alta capacidad antioxidante. Por lo tanto, gracias a su composición fenólica y alta capacidad antioxidante, la fruta de *Condalia ericoides* puede considerarse un alimento funcional.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Alimentos Funcionales, Campo Experimental Bajío del INIFAP Celaya, Guanajuato. Por permitir el desarrollo de este proyecto, a través del apoyo económico y de sus instalaciones.

REFERENCIAS

[1] Wong J. L.G., Thornber K. y Baker Nell; FAO. (2001). Evaluación de los Productos Forestales no Madereros, Experiencia y Principios Biométricos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

[2] Singleton VL, Orthofer R, Lamueala-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299. Pp: 152-178.

[3] Desphande SS, Cheryan, M. (1985). Evaluation of Vainillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. Journal Food Science. Vol. 50. Pp. 905-916.

[4] Dewanto Richard, Jacques Machiex J., Fleuriet A. (2002). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. Cereal Chemistry. Vol. 76. No.3. Pp. 350-354.

[5] Abdel E. S., Hucl P. (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. Cereal Chemistry. Vol. 76. No.3. Pp. 350-354.

[6] Ramamurthy, M.S., Maiti, B., Thomas, P. Y. and Nair, M. (1992). High performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*solanum tuberosum*) during wound healing. J Agric, Food Chemistry. Vol. 40. Pp: 569-572.

[7] Zapata Mehdi Azi y Dufor Zhao (1992). Content ascorbic Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. Nutrition and Cancer. Vol. 62. No. 1. Pp: 1-20.

[8] Brand Williams W., Cuvelier M. E. y Berset C. (1995). Use of a Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. Labensm. Wiss u Technol. Vol. 28. Pp. 25-30.

[9] Benzie Iris F. F. y Strain J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry. Vol 239. Pp. 70-76.

[10] Van Den Berg R., Haenen G. R. M. M., Van Den Berg H., Bast A. (1999). Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chemistry, Vol. 66. Pp: 511-517.

[11] Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49. Pp: 4619-4626.

[12] Salunkhe D. K., Chavan J. K. y Kadam S. S. (1989). *Dietary tannins: consequences and remedies*. CRC Press. United States of America.

[13] Zarei Mehdi, Azizi Majid y Bashir-Sadr Zeinolabedin. (2011). Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit during ripening. Fruits. Vol. 66. Pp: 121-129.

[14] INTA-CORFO (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos). (2015). *(ORAC) Base de datos de actividad antioxidante y de contenido de polifenoles totales (PTF) en frutas* [en línea]. Enero 2015. [Fecha de consulta: 14 de Enero de 2015]. Disponible desde: http://www.portalantioxidantes.com/orac-base-de-datos-actividad-antioxidante-y-contenido-de-polifenoles-totales-en-frutas-4/

[15] Vuarant C. O. (2010). *Arándanos: Fac. de Ciencias de la Alimentación*.

[16] Herrera Hernández M. G. (2008). Efecto del Estado de Madurez y el Almacenamiento Sobre la Calidad Funcional del Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis. Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México. Pp. 85.

[17] Zhao Yanyun. (2007). *Berry fruit: Value-added products of health promotion*. CRC Press.

[18] Ribera A. E., Reyes Díaz M., Alberdi M., Zúñiga G. E., y Mora M. L. (2010). Antioxidant compounds in skin and pulp of fruit change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (Vaccinium corymbosum L.) growth in southern Chile. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. Vol. 10. No. 4. Pp: 509-536.

[19] Martínez Cruz N. S., Arévalo Niño K., Verde Star M. J., Rivas Morales C., Oranday Cárdenas A., Núñez González M. A., Morales Rubio M. E. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 42. No. 4. Pp: 66-71.

[20] Preedy V. R. (2014). *Processing and Impact on Active Components in Food*. Academic Press. United States of America.

[21] Mahmood Tahir, Anwar Farooq, Bhatti Ijaz Ahmad y Iqbal Tahira. (2013). Effect of maturity on proximate composition , phenolics and antioxidant attributes of cherry fruit. Pak. J. Bot. No. 45. Vol. 3. Pp: 909-914.

[22] Andjelkovic M., Radovanovic B., Radovanovic A., Andjelkovic A. M. (2013). Changes in Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grapes cv. Vranac During Ripening. S. Afr. J. Enol. Vitic. Vol. 34. No. 2. Pp. 147-155.

[23] Othman A., Mhd Jalil A. M., Kin Weng K., Ismail A., Abd Ghani N. y Adenan Ilham. (2010). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. African Journal of Biotechnology. Vol. 9. No. 7. Pp. 1052-1059.

[24] Rezende Marques T., Duarte Correa A., Boreli dos Reis L. J., Patto de Abreu C. M. y Assaid Simao A. (2013). Chemical Constituents and technological functions properties of acerola (Malphigia emarginata DC.) waste flour. Food Science and Technology. No. 33. Vol. 3. Pp. 526-531.

[25] Gibson L., Vasantha Rupashinge H. P., Forney C. F., Eaton L. (2013). Characterization of Changes of Polyphenols and Antioxidant Capacity and Physico-chemical Parameters During lowbush Blueberry Fruit Ripening. Antioxidants. Vol. 2. Pp. 216-229.

[26] Henríquez C., López Alarcón C., Gómez M., Lutz M. y Speisky Hernán. (2011). Time-Dependence of Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Index in Chilean Apples and Berries. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 61. No. 3. Pp. 323-332.

[27] Fawole Olaniyi A. y Opara Umezuruike L. (2013). Effects of Maturity Status on Biochemical Content Polyphenol Composition and Antioxidant Capacity of Pomegranate fruit arils (cv. Bhagwa). South African Journal of Botany. Vol. 85. Pp. 23-31.

[28] Celik Hüseyin, Özgen Mustafa, Serce Sedat y Kaya Cemal. (2008). Phytochemical Accumulation and Antioxidant Capacity at four Maturity stages of Cranberry fruit. Scientia Horticulturae. Vol. 117. Pp. 345-348.

[29] Huang Wu-yang, Zhang Hong-cheng, Liu Wen-xu y Li Chun-yang. (2012). Survey of Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Blueberry, Blackberry and Strawberry in Nanjing. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine and Biotechnology). Vol.13. No. 2. Pp. 94-102.

[30] Shahidi F. y Alasalvar C. (2012). *Dried Fruits: Phytochemicals and Health Effects.* John Wiley & Sons. United States of America.

[31] Ramadane Dris, Mohan Jain S. (2004). *Quality Handling and Evaluation: Volume 3: Quality Handling and Evaluation*. Springer Science & Business Media United States of America.

[32] Elisia I. y Kitts David D. (2008). Anthocyanins Inhibit Peroxyl Radical-induced Apoptosis in Cacao-2 cells. Molecular Cell Biochemistry. Pp. 139-145.

[33] Serra H. M. y Cafalo Thamara A. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectiva en ojo. Acta Bioquímica clínica Latinoamericana. Vol. 41. No. 4. Pp. 525-532.

CONTRIBUCIÓN NUTRIMENTAL DE LA CERVEZA MEDIANTE UN CONSUMO MODERADO
NUTRIMENTAL CONTRIBUTION OF BEER THROUGH MODERATE CONSUMPTION.

[*1]Vázquez-Luna, A., [2]Palmeros, E.C., [3]Flores-Vela, S.P., [2]Díaz-Vázquez, A.E., [1]Díaz-Sobac, R.

1. Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, CP 91190.
2. Facultad de Nutrición, Carmen Serdán s/n esquina Iturbide, Col. Centro CP 91700, Veracruz, Ver.
3. Facultad de Química Farmacéutica Biológica campus Xalapa, Universidad Veracruzana. Zona Universitaria. CP 91000. Xalapa, Ver.

Autor para correspondencia: almvazquez@uv.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
La cerveza es una bebida alcohólica con alto consumo en nuestro país sin que se le asocie ningún aporte nutrimental. Actualmente México supera a Alemania al ubicarse como el cuarto productor cervecero en el mundo, así como el exportador número uno del mundo, con presencia en más de 180 países. El objetivo de este trabajo fue asociar la preferencia de consumo de cerveza en una población estudiantil con su posible valor nutrimental de dichas preferencias. Se llevó a cabo una encuesta entre 100 estudiantes con edades entre 18 y 26 años, 50 hombres y 50 mujeres. Se eligieron las cervezas con mayor porcentaje de consumo, siendo una oscura y otra ámbar, se les determinó azúcares reductores, proteínas, acidez, pH, polifenoles y flavonoides totales, así como el flavonoide mayoritario en cada una de las cervezas, y los principales flavonoides presentes en las mismas. Los resultados obtenidos fueron azúcares reductores 0.2 ± 0.07% independientemente del tipo de cerveza, proteínas se observaron diferencias entre las cervezas, ya que se tuvo 3.2 ± 0.1% para la oscura y 2.1 ± 0.08% para la ámbar, para los polifenoles y flavonoides se obtuvieron 69 ± 1.9mg/100mL y 172.3 ± 2.6mg/100mL, respectivamente para la oscura y para la ámbar las concentraciones fueron menores 12.5 ± 0.5% y 50.67 ± 1.3% respectivamente. Para el caso de la acidez se obtuvieron valores muy parecidos siendo 0.33 ± 0.07% y 0.29 ± 0.05% y finalmente para pH en la cerveza oscura fue de 4.51 y en la ámbar 4.38. Se determinó por HPLC que los contenidos de quercetina y catequina fueron más altos para la cerveza oscura.

Palabras clave: Cerveza; polifenoles; flavonoides; quercetina; consumo moderado; nutrimental.

INTRODUCCIÓN

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más antiguas con alto consumo principalmente en jóvenes sin que se le asocie ningún aporte nutrimental, sin embargo el consumo de esta depende de dos factores importantes, los hábitos alimenticios y el estilo de vida de las diversas poblaciones. El consumo de cerveza moderado puede formar parte de una dieta saludable [1]. Actualmente México supera a Alemania al ubicarse como el cuarto productor cervecero en el mundo, así como el exportador número uno del mundo, con presencia en más de 180 países [2].

La cerveza es una bebida fermentada a base de malta, lúpulo, agua y levaduras. Los consumidores clasifican la cerveza según su color: rubia, rojiza, ámbar u oscura. Los tipos de cerveza se determinan por la forma de fermentar y los elementos de su elaboración distinguiendo tres tipos: la fermentación

espontánea (levaduras naturales), la fermentación baja y alta. La cerveza contiene compuestos fenólicos, minerales, vitaminas, fibra, proteínas, ácidos orgánicos y posee capacidad antioxidante [3].

Los polifenoles son un grupo de interés en la cerveza al ser los responsables de sus diversas propiedades funcionales y en sus características sensoriales (color, aroma, sabor) y nutricionales. Los compuestos fenólicos presentes en la cerveza provienen esencialmente de la cáscara de la cebada malteada y del lúpulo, siendo este último el que representa la mayor parte de compuestos fenólicos de la cerveza, tienen capacidad antioxidante. El contenido de la proteína proviene de la cebada, en cervezas con alto grado de alcohol es importante que su contenido de proteínas sea alto [4].

Se han llevado a cabo estudios en otros países que reportan los efectos benéficos del consumo moderado de cerveza asociados a su composición nutrimental, por lo que en el presente estudio se determinó el contenido en polifenoles, flavonoides, proteínas, azúcares reductores y acidez, en dos cervezas comerciales de mayor consumo en una población determinada y que le podrían dar un valor agregado a éste tipo de productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una encuesta a 100 estudiantes entre 18 y 26 años, se seleccionaron a 50 hombres y 50 mujeres de las ciudades de Xalapa y Veracruz para conocer sus preferencias de consumo, además de preguntarles si conocían el contenido nutrimental de dicho producto.

Muestras

Se seleccionaron dos tipos de cerveza del mercado, en base a la preferencia de los consumidores según la encuesta que se les realizó a los estudiantes. Un lote de 20 cervezas de cada marca fueron comprados en una tienda de conveniencia para llevar a cabo las diferentes pruebas.

Determinación de polifenoles

Método de Folin-Ciocalteu

El cual consistió en ocupar 200 µL de la muestra de cerveza y 200 µL de reactivo *Folin-Ciocalteu*, dejando reaccionar durante tres minutos. A continuación, se añadieron 2 mL de carbonato de sodio (7%) y 2.6 mL de agua destilada, dejando reaccionar durante una hora. Se construyó una curva de calibración utilizando concentraciones de 0 a 120 de ácido gálico (0.1mg/mL), posteriormente se midieron las absorbancias a 750 nm [5].

Determinación de flavonoides

Método de flavonoides totales

Se utilizaron 250 µL de muestra de cerveza, se le añadieron 1250 µL de agua destilada y después 75 µl de $NaNO_3$ al 5%, se dejaron agitar durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 150 µL de $AlCl_3$ al 10%, se dejó reposar durante 5 minutos y después de este tiempo se le agregaron 500 µL de NaOH 1 M, se aforó a 3 mL y posteriormente se leyó la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Vis [6]. La concentración de flavonoides totales se calculó con base en una curva estándar de quercetina (2.7mg/10ml).

Cuantificación por cromatografía de líquidos

Se determinaron los flavonoides mayoritarios presentes en cada cerveza, utilizando un equipo Varian model ProStar 210 con una columna C18 de fase reversa 4.6x250mm, 5µm (Agilent, Wilmington, DE, USA) y con detector UV. El volumen de inyección de todas las muestras fue de 15µL. Se utilizó una longitud de onda de 290nm. La fase móvil A fue una solución preparada al 2% de ácido acético en agua tridestilada. La fase móvil B fue acetonitrilo. La velocidad de flujo fue de 0.6 mL/min. Se realizó una curva de calibración para cada uno de los siguientes estándares: ácido gálico (Sigma Aldrich), catequina (Sigma Aldrich), rutina (Sigma Aldrich), morina (Fluka Analytical) y kaempferol (Sigma Aldrich).

Determinación de proteínas

Método de Bradford

Este método está basado en la unión especifica del colorante Coomassie blue G-250 con las proteínas disponibles de las muestras. Se construyó una recta de calibración a partir de cantidades conocidas de proteína utilizando como referencia albumina (0.1µg/µL). Los análisis se realizaron por duplicado. Se agregó a 50 µL de la muestra 250 µL de agua y 3 mL de reactivo de Bradford, protegiendo las muestras de la luz, posteriormente se leyeron las absorbancias a 595 nm.

Determinación de azúcares reductores

Método de Fehling

Se realiza el método con modificaciones descrito en la NMX-V-006-1983: Bebidas alcohólicas. Azúcares reductores directos y totales. Se colocaron 10 mL de reactivo de Fehling en un matraz Erlenmeyer adicionando 40 mL de agua, se puso en ebullición la solución del matraz y se valoró con solución de glucosa al 0.5 %, adicionando 2 gotas de azul metileno al 1% y continuando la titulación hasta el punto final de color rojo-ladrillo. Se realizó lo mismo con la muestra (desgasificada) en lugar de la solución de glucosa, entre la ebullición y la valoración, no deben pasar más de 6 minutos.

Determinación de acidez

Valoración potenciométrica

Una muestra de 100 mL se calentó 30 min a 60-70°C para eliminar el dióxido de carbono, se dejó enfriar y se determinó la acidez en una alícuota de 50mL con NaOH 0.1N, valorado titulando gota a gota hasta llegar a un pH de 8.3, se lee el volumen gastado de NaOH. La acidez fue expresada como % de ácido láctico.

Determinación de pH

Se determinó la concentración de iones hidrogeno con un medidor de pH ajustado a 4.0 y 7.0 con soluciones tampón, la muestra se somete a calentamiento (60-70°C) para desgasificar, se dejó enfriar y se leyó el pH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de la encuesta

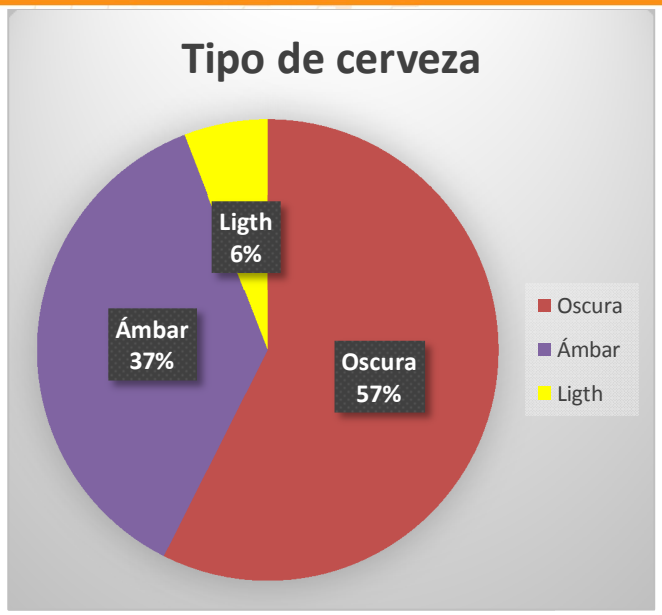


Figura 1. Preferencia del consumidor del tipo de cerveza

Se realizó una encuesta en donde se les pregunto cuál tipo de cerveza prefieren consumir, teniendo entre sus opciones tres tipos de cerveza ámbar, ligth y oscura. Como se puede observar en la gráfica los consumidores optan por consumir más una cerveza oscura y ámbar con respecto a una cerveza tipo ligth. Por esto se decidió realizar las determinaciones para las cervezas tipo ámbar y oscura al ser las de mayor consumo por los estudiantes.

Determinaciones analíticas realizadas

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos, como podemos observar la cerveza oscura tuvo un mayor contenido de polifenoles y flavonoides totales que la clara, resultados parecidos obtuvieron González et. al., [4] cuando llevaron a cabo un estudio de cervezas que se consumen en España, si consideramos que una cerveza tiene 355 mL, el contenido de estos compuestos se vería incrementado considerablemente sobre todo para la cerveza oscura. Por otra parte, Kaplan et. al., [7], determinaron que la cerveza al igual que el vino proporcionan beneficios a la salud por la capacidad antioxidante de los polifenoles y flavonoides, recomendando el consumo de una cerveza por día para mujeres y dos para los hombres.

Tabla 1. Resultados obtenidos de cada determinación para cada tipo de cerveza.

Determinación	Resultados obtenidos*	
	Oscura	Ámbar
Polifenoles (µg/100mL)	69 ± 1.9	12.5 ± 0.5
Flavonoides (µg/100mL)	172.3 ± 2.6	50.67 ± 1.3
Proteínas (mg/100mL)	3.2 ± 0.1	2.1 ± 0.08

Azúcares reductores (mg/100mL)	0.2 ± 0.07	0.2 ± 0.07
Acidez	0.33 ± 0.07	0.29 ± 0.05
pH	4.51	4.38

*Representa la media y desvaición estándar de tres repeticiones

En cuanto a las proteínas la cerveza oscura tuvo un mayor contenido que la ámbar por lo que se podría recomendar más su consumo por su aporte nutrimental, recomendación que también hace Denke et. al.,[7] ya que ellos determinaron que la cerveza a diferencia de cualquier tipo de vino es su contenido proteico independientemente de su contenido de alcohol. Los valores de azúcares reductores fueron bajos lo que se considera deseable para este tipo de producto, ya que facilita la digestión pudiéndose recomendar como una bebida con bajo índice glucémico[4], [7]. En cuanto al porcentaje de acidez y pH la norma PROY-NOM-199-SCFI-2015, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba[8]. específica que el pH de una cerveza debe estar entre 2.5 y 5 como limites, en cuanto a su acidez total expresado en g/l de ácido láctico debe ser de 10 como máximo. Por lo que este tipo de cervezas cumplen con lo requerido.

Cuantificación de flavonoides por Cromatografía de Líquidos

En la figura 2 se muestra un cromatograma HPLC obtenido de la cerveza oscura, se determinó la presencia de ácido gálico, rutina, catequina y quercetina con tiempos de retención de 8.8, 10.28,9 11.43, y 13.79, respectivamente.

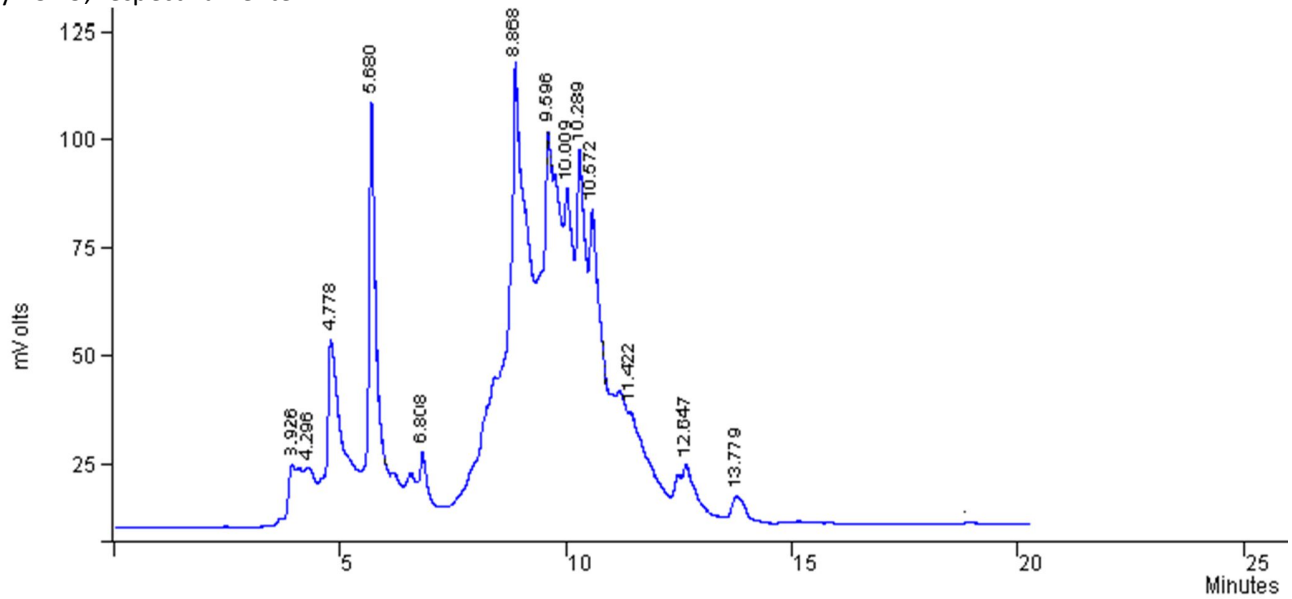


Figura 2. Cromatograma representativo de flavonoides presentes en cerveza oscura

En la figura 3 se muestra un cromatograma HPLC obtenido de la cerveza ámbar, se determinó la presencia de ácido gálico, ácido clorogénico, rutina y quercetina con tiempos de retención de 8.8, 10.5, 11.4 y 13.7, respectivamente.

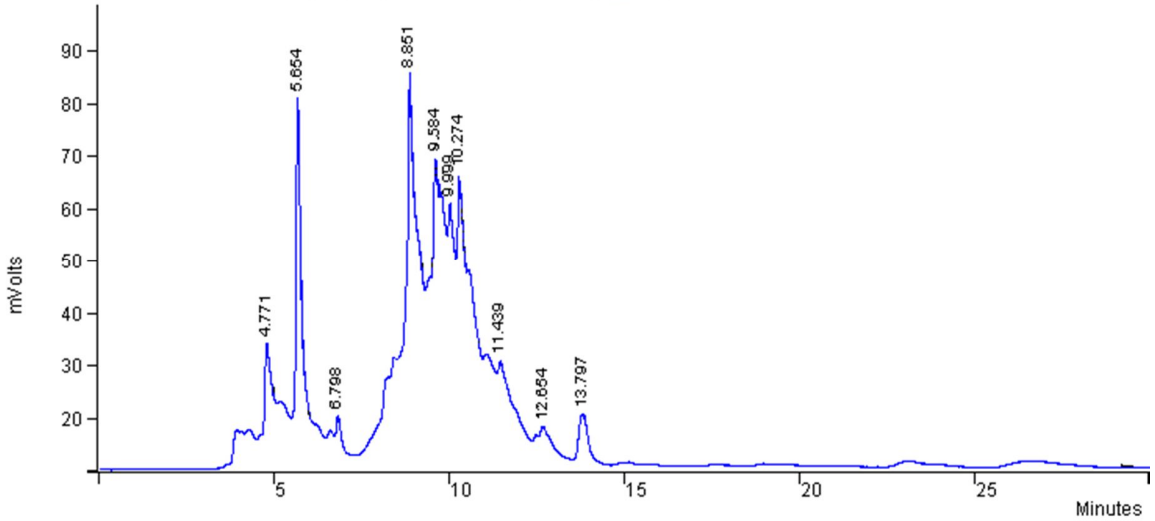


Figura 3. Cromatograma HPLC representativo de flavonoides presentes en cerveza ámbar.

En la cerveza oscura se encontró que el contenido más alto de flavonoides fue catequina (Tabla 2), de ahi rutina y ácido gálico casi en la misma cantidad, siendo quercetina la de menor concentración. En cuanto a la cerveza ámbar se encontró un mayor contenido de ácido gálico y rutina, incluso con respecto a la cerveza oscura, además de ácido clorogénico que no tiene la oscura.

Tabla 2. Resultados de los flavonoides obtenidos en ambas cervezas.

	Tipo de cerveza	
Flavonoide (mg/mL)	*Oscura*	*Ámbar*
Ácido gálico	5.08	8.23
Ácido clorogénico	---	4.22
Rutina	5.48	6.31
Quercetina	1.09	0.72
Catequina	7.97	---

Los polifenoles de la cerveza provienen principalmente de la cáscara de cebada malteada y del lúpulo, los cuales contienen principalmente ácidos fenólicos como el ferúlico y gálico; flavonoides de tres tipos pertenecientes a la familia de catequinas, antocianos y flavonoides como quercetina y kaempferol según lo descrito por Gonzáles et. al.,[4]. El contenido final de estos compuestos depende del proceso de fabricación por lo que los contenidos pueden variar sin embargo predominan proantocianidinas, catequinas y flavonol como quercetina [9]. Los resultados que se obtuvieron indicaron que sólo la cerveza oscura tuvo catequina, incluso en mayor cantidad la quercetina en ésta que para la cerveza ámbar. La cerveza oscura podría contener mayor cantidad de lúpulo proporcionando a la cerveza niveles de fenoles más altos que una ámbar, sin embargo, en este estudio no fue posible idnetificar todos los que se observaron en los cromatogramas.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados se observó una correlación entre la determinaciones químicas y la preferencia del consumidor. Por lo que se puede concluir que el consumo moderado de cerveza ámbar puede considerarse como parte de una alimentación saludable en una población de adultos jóvenes sanos entre 18 y 26 años.

REFERENCIAS

[1] A. Marcos, M. López Díaz-Ufano, and V. Pascual Fuster, "[Could the moderate consumption of beer be included within a healthy diet?].," *Semer. / Soc. Española Med. Rural y Gen.*, vol. 41 Suppl 1, pp. 1–12, 2015.

[2] J. Romeo, L. Díaz, M. González-Gross, J. Wärnberg, and A. Marcos, "Contribución a la ingesta de macro y micronutrientes que ejerce un consumo moderado de cerveza," *Nutr. Hosp.*, vol. 21, no. 1, pp. 84–91, 2006.

[3] M. Suárez Díaz, "Cerveza: componentes y propiedades," pp. 1–99, 2013.

[4] M. L. González S. J., P. Muñiz R., and V. Valls B., "Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo," *Cerveza y Salud*, vol. 8, p. 57, 2001.

[5] E. García, I. Fernández, and A. Fuentes, "Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu," *Univ. politécnica Val.*, vol. 1, pp. 2–8, 2015.

[6] M. A. Gracia Nava, "Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales," *Univ. Auton. Querétaro*, pp. 1–4, 2006.

[7] M. a Denke, "Nutritional and health benefits of beer.," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 320, no. 5, pp. 320–326, 2000.

[8] P. De Norma *et al.*, "Dof: 29/02/2016," 2017. [Online]. Available: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5428197&fecha=29/02/2016.

[9] C. W. Bamforth, "Nutritional aspects of beer - A review," *Nutr. Res.*, vol. 22, no. 1–2, pp. 227–237, 2002.

EFECTO DE LA DENSIDAD DE PLANTA Y DOSIS DE FERTILIZACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE ELOTE EN NUEVOS HÍBRIDOS EXPERIMENTALES DE MAÍZ.

[2]Andrés-Meza, P., [1]Rodríguez-Montalvo, F.A., [2]Leyva-Ovalle, O.R., [1]Sierra-Macías, M., [3]Espinosa-Calderón, A., [4]Vázquez-Carrillo, M., [5]Tadeo-Robledo, M., [6]Gómez-Montiel, N.O., [7]López-Romero, G., [2]Cebada-Merino.

1. Campo Experimental Cotaxtla-INIFAP. 92277. Medellín de Bravo, Veracruz.
2. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Camino antigüo Amatlán-Peñuela, s/n, región Orizaba-Córdoba. Universidad Veracruzana.
3. Campo Experimental Valle de México-INIFAP. 56250. Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. 4. Laboratorio de Calidad de Maíz, Campo Experimental Valle de México-INIFAP. 56250. Coatlinchán, Texcoco, Estado de México.
5. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 54714. Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
6. Campo Experimental Iguala-INIFAP.40000. Iguala, Estado de Guerrero.
7. Agroecosistemas Tropicales, Colegio de Postgraduados. 91690. Predio Tepetates entre Puente Jula y Paso San Juan, Veracruz.

*Autor para correspondencia: pandres@uv.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

El Maíz (*Zea mays* L.) es una gramínea anual, este cereal tiene una amplia diversidad de usos en grano y planta, tanto para la alimentación humana como animal, así como en la industria [1]. Una de las formas de consumo más tradicional y popular en México, es en elote (estado inmaduro de la mazorca), y representa mayores ventajas respecto al aprovechamiento del grano. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la densidad de población y dosis de fertilización sobre el rendimiento y calidad de elote en nuevos híbridos tropicales de maíz. En 2015 se evaluaron tres nuevos híbridos experimentales de maíz y un testigo comercial en el terreno experimental de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias en el municipio de Amatlán de los Reyes, Córdoba, Veracruz. Se utilizó un diseño factorial con arreglo en parcelas subdivididas, con dos repeticiones. La siembra se realizó de forma manual a tapa pie, se depositaron dos semillas por golpe, la unidad experimental constó de un surco de 5 m de longitud y una separación entre surcos de 0.8 m. Los factores bajo estudio fueron: a) híbridos (parcela grande); b) densidad de población (parcela media), y c) dosis de fertilización (parcela chica). Se midieron 12 variables de planta y elote. Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas (P≤0.05) para el factor híbrido (H), en las variables rendimiento de elote (RENDELO), grados Brix (°BRIX), índice de área foliar (IAF) y cobertura de elote (COBELO). Para el factor densidad de planta (DP) se encontraron diferencias significativas (P≤0.05) en altura de elote (ALTELO) y RENDELO. En el factor dosis de fertilización (DF) fueron significativos (P≤0.01) en altura de planta (ALTPTA), ALTELO, diámetro con hoja (DCHJA) y diámetro sin hoja (DSHJA). Cuadrados medios para la interacción H*DP fue significativo (P≤0.05) para ALTELO, y altamente significativo (P≤0.01) para H*DF y DP*DF en ALTPTA, ALTELO y longitud de pedúnculo (LPED), respectivamente. Se observa una ventaja del híbrido HE-3B de 16,495 kg ha-1 de elote fresco, ligeramente superior a la media general (15,072 kg ha-

1) y con un 2% superior al testigo comercial A-7572. Así mismo, la densidad de 41,667 plantas ha-1 produjo el mayor rendimiento de elote fresco. El testigo comercial A-7573 superó numéricamente a los nuevos híbridos experimentales con 8.5 °Brix en tanto que el HE-1B presentó 7.2 °Brix valor ligeramente superior a la media (7.03 °Brix).

Palabras clave: *Zea mays* L; elote; rendimiento y calidad; componentes tecnológicos.

REFERENCIAS

[1] Palafox, C. A.; Sierra, M. M.; Rodríguez, M. F. A.; Ugalde, A. F. J. 2010. Tecnología de producción para maíz de grano y elote para el trópico húmedo de México. Folleto para Productores Núm. 14. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Cotaxtla. Veracruz, México.14 p.

DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO GENERAL DE ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN EL DESECHO DEL GUSANO DE HARINA (*Tenebrio molitor*).

[1*]Villa-Cisneros, C.A., [1]Luna-Díaz, J.J., [1]Ramírez-Anguiano, A.C., y [1]Velasco-Ramírez, S.F.

1. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Departamento de Química, Boulevard Marcelino García Barragán # 1451 Guadalajara, Jalisco, México 44430

*Autor para correspondencia: arlimvilla@gmail.com

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN
La cantidad de grasas que pude ser obtenida de los insectos ha sido de gran estudio por ser grasas de carácter insaturado las cuales son bastante apreciadas por el público. Actualmente el aceite comestible se obtiene de semillas oleaginosas de las cuales la gran mayoría solo se utiliza el aceite extraído de la semilla dejando parte de la materia como desperdicio. En el caso de los insectos esto se puede aprovechar, ya que la gran cantidad de material lipídico que proporcionan no solo es por parte del insecto sino que también se puede extraer materia lipídica de desecho; en el presente estudio se extrajo el material lipídico del desecho del Tenebrio molitor. De la extracción se determinó el índice de yodo (54.19%), índice de saponificación (218.15 mg KOH/ g de muestra), índice de peróxidos no detectado a tiempo cero, índice de acidez (1.1 a 1.5), e índice de refracción (1.472) a 25ºC.

Palabras clave: Desecho; perfil lipídico; *Tenebrio molitor*.

INTRODUCCIÓN

Es conocido como "Entomofagía" al hábito del consumo de insectos, el cual se practica en distintas regiones del mundo como Asia, África, Australia y algunas partes de América. En general los insectos son excelentes fuentes de vitaminas, minerales, proteínas, lípidos y carbohidratos [1, 2], por lo que considerar la ingesta de insectos como fuente nutricional sería una buena opción, ya que las fuentes alimenticias en la actualidad no son suficientes para el abastecimiento de todos los consumidores [3].

La idea en la cual se basa la entomofagía es que, la práctica de consumo de insectos no es del todo saludable sino que también es una manera con la cual se contribuye a una mejor calidad en el medio ambiente. El desarrollo de las especies para consumo humano se puede ver favorecido si se comienza a incrementar el consumo de insectos, ya que los insectos requieren de menor tiempo de crecimiento y en comparación con los animales que se consumen normalmente tales como; pollo, cerdo, res, entre otros, los insectos se reproducen a mayor velocidad, por lo que no es necesario el tratar de acelerar su desarrollo, y, requieren de menos recursos para su reproducción sin dejar de brindar los mismos nutrientes que la carne [3, 4].

En algunos otros países de occidente el consumo de insectos no es considerada una práctica común ni totalmente aceptada por los habitantes. Cabe mencionar que también los compuestos anti-nutritivos y perjudiciales para la salud del "entomófago" deben ser tomados a consideración, ya que al igual que los

alimentos de origen animal que son consumidos comúnmente, el consumir insectos pude ser perjudicial si estos llegan a contener alguna sustancia toxica. En la actualidad solo se han reportado reacciones alérgicas a sustancias contenidas en los insectos [2].

Existen distintas instituciones alrededor del mundo que se encargan del estudio de los insectos. Los científicos encargados de las investigaciones en cuanto a las propiedades y calidad de vida de los insectos (entomología), se encuentran a favor del consumo de éstos por los humanos [3]. Si bien la Entomofagía está causando gran atención por los diferentes beneficios que se han estado descubriendo, es bien sabido que el consumo de insectos se ha practicado desde tiempos antiguos. Los insectos se utilizan tanto en alimentos como en piensos esto se debe al gran aporte nutricional que brindan al consumidor ya sea especie humana o cualquier otro animal [5].

Distintas investigaciones han determinado que la ingesta de 100 g de cualquier especie aporta de 40 a 80% de proteínas, estas cifras pueden contribuir de manera positiva a la desnutrición infantil en distintas partes del mundo [3]. De los insectos se puede aprovechar gran cantidad de sustancias que se requieren en la dieta básica por lo que la recolección de insectos y tratamiento adecuado es esencial para su posterior consumo [5].

Generalmente los insectos son estudiados para detectar los problemas que causan a la sociedad, dejando a un lado el aporte nutricional. Los extractos lipídicos que se pueden obtener de los insectos así como de su desecho son una muy interesante fuente de estudio que contribuye a la utilización de toda la materia y no solo de una pequeña porción como es el caso de las semillas como lino, soya, cacahuate y de algunas plantas como el ricino que solo son utilizadas para obtener aceite comestible [6].

Actualmente es necesaria la investigación de otras alternativas de fuente alimenticia tanto para la proporción de proteínas asociada al consumo de carne, carbohidratos, vitaminas, así como de grasas siendo los aceites de extractos de semillas los más consumidos, que por el hecho de ser de tipo insaturado son bastante apreciados por el público. Se han realizado estudios en los cuales se realizan las caracterizaciones del aceite obtenido de larvas de *Tenebrio molitor*, pero poco se sabe de la materia lipídica que se puede obtener del desecho del *Tenebrio molitor* [2, 6]. El objetivo de este trabajo es dar a conocimiento de las características del extracto lipídico del desecho del *Tenebrio molitor* para posteriormente permitir que se realicen un mayor número de investigaciones relacionadas al desecho de los insectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cada una de las siguientes determinaciones en el desecho del gusano, se realizaron extracciones con hexano colocando aproximadamente de 2 a 2.5 gramos de desecho de gusano en un vaso de precipitados que fue llevado a peso constante se mantuvo en agitación constante por un periodo de 2 a 2 y media horas, posteriormente se realizó una decantación y se procedió a evaporar el hexano por destilación en baño maría para la obtención del extracto lipídico antes de cada determinación.

Determinación del índice de yodo.

Se colocó la cantidad de extracto lipídico obtenido de la destilación en un matraz erlenmeyer de 250 ml, se disolvió con 10 ml de $CHCl_3$ más 15 ml de reactivo de yodo monoclorurado (Wijs), se tapó con papel aluminio y se dejó reposar por un periodo de 2 horas en la oscuridad. Una vez transcurrido el periodo de

tiempo se añadieron 10 ml de KI al 7% y se dejó reposar la muestra por 15 minutos más, transcurridos los 15 min se tituló la muestra con una solución de Na2S2O3 0.1 N utilizando almidón al 1% como indicador. Se realizó un blanco en las mismas condiciones que la muestra y con el mismo tiempo de reposo.

Determinación del índice de saponificación.
Se trabajó en el mismo matraz de dos vías en el que se obtuvo el extracto lipídico, posteriormente se colocaron 20 ml de KOH alcohólica 0.1 N añadiendo 5 gotas de fenolftaleína como indicador. Se colocó a reflujo con un refrigerante de rosario durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a titular la muestra con una solución de HCl 0.1 N hasta un vire incoloro. Se realizó un blanco en las mismas condiciones que la muestra.

Determinación del índice de peróxidos.
Se colocó el extracto lipídico en un matraz erlenmeyer de 250 ml, se añadieron 20 ml de CH3COOH:CHCl3, posteriormente se añadieron 0.5 ml de KI saturado y se dejó reposar por un periodo de 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se procedió a titular la muestra con Na2S2O3 0.1 N hasta un vire incoloro, utilizando almidón al 1% como indicador. Se realizó un blanco en las mismas condiciones que la muestra.

Determinación del índice de acidez.
Se colocó el extracto lipídico en un matraz erlenmeyer de 250 ml, se añadió una mezcla de Etanol-Éter (agitando la solución) para disolver. Se realizó realizo la titulación con KOH alcohólica 0.05 N utilizando fenolftaleína como indicador hasta un vire incoloro. Se realizó un blanco en las mismas condiciones que la muestra.

Determinación del índice de refracción.
Del extracto lipídico obtenida por la destilación, se tomó una muestra característica y se colocó en el refractómetro para su lectura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Tabla 1. Comparación de índices del extracto lipídico del desecho de *Tenebrio molitor* con otras fuentes de aceite comestible [7-14].

Tipo de aceite	Indice de yodo en %		Indice de saponificación, mg KOH/ g muestra		Indice de peróxidos, meq O2/ Kg muestra		Indice de acidez en %		Indice de refracción	
Tenebrio molitor	54.19		218.15		ND a tiempo cero		1.1 – 1.5		1.472	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Manteca	45.0	70.0	192.0	203.0	----------	6.0	----------	1	1,448 a (40°C)	1,460 a (40°C)
Mantequilla	30.0	38.0	223.0	232.0	----------	N/A	----------	2.0 *	1.4527 a (10°C)	1.4566 a (10°C)
oliva virgen	79.5	91.0	187.0	195.0	----------	20.0	1.0	1.5	1.4654 a (25°C)	1.4683 a (25°C)
oliva refinado	79.5	91.0	187.0	195.0	----------	20.0	3.0	0.5	1.4654 a (25°C)	1.4683 a (25°C)
Oliva de mezclas	79.5	91.0	187.0	195.0	----------	20.0	2.3	2.3	1.4654 a (25°C)	1.4683 a (25°C)
maíz	103.0	128.0	187.0	197.0	----------	2.0	----------	0.05	1.465 a (40°C)	1.468 a (40°C)
cártamo de Alto poli-insaturado	136	148	186	198	----------	2.0	----------	0.05	1.467 a (40°C)	1.470 a (40°C)
cártamo Alto mono-insaturado	80	95	NR	NR	----------	2.0	----------	0.05	1.4680 a (40°C)	1.4720 a (40°C)
canola	110	126	182	193	----------	2,0	----------	0,05	1,465 a (40°C)	1,467 a (40°C)
girasol	118	145	188	194	----------	2,0	----------	0,05	1,467 a (40°C)	1,469 a (40°C)
soya	118	139	189	195	----------	2,0	----------	0,05	1,466 a (40°C)	1,470 a (40°C)

Nota: ND: No detectado. NR: No reportado. N/A: No aplica. *Acidez expresada como % de ácido láctico.

En la tabla 1 se puede observar diferencias entre los índices de distintos productos con material lipídico los cuales son comparados con los resultados obtenidos en el desecho del *Tenebrio molitor*.

Se puede observar las semejanzas en los datos obtenidos del extracto lipídico del desecho con los de manteca y mantequilla, teniendo un índice de yodo de 54.19% para el desecho de *Tenebrio molitor*, un rango mínimo y máximo de índice de yodo de 45.0% a 70.0% en manteca y de 30.0% a 38.0% en mantequilla. En el caso de los aceites los valores del índice de yodo van desde 79.5% hasta 148% muy por encima de los obtenidos en el extracto lipídico de desecho de *Tenebrio molitor*.

El índice de saponificación es de 218.15 mg KOH/ g de muestra; este valor es mayor al de los aceites y manteca cuyo valor máximo para la manteca es de 203.0 mg KOH/ g de muestra y es menor al valor de mantequilla con un valor mínimo de 223.0 mg KOH/ g de muestra.

No se detectó índice de peróxidos a tiempo cero en el extracto de desecho de *Tenebrio molitor*.

En cuanto a índice de acidez cuyo valor es de 1.1 a 1.5% se encuentra en el rango permitido en todos los aceites comestibles y en la mantequilla, solo excede el límite de acidez en el caso de la manteca siendo de 1% de acidez expresada en ácido oleico (al igual que los aceites).

El índice de refracción cuyo valor es 1.472 es muy similar tanto para las grasas obtenidas de origen animal como las de origen vegetal.

CONCLUSIONES

Al igual que los productos con material lipídico de origen animal, el extracto de desecho de *Tenebrio molitor* presento índices muy similares con porcentajes de yodo bajos en comparación con aceites comestibles e índice de saponificación altos en comparación de los mismos.

El porcentaje de índice de yodo indica una cantidad balanceada de ácidos grasos de carácter tanto insaturado como saturado.

Serían necesarios estudios posteriores que determinen el uso del extracto lipídico de desecho de *Tenebrio molitor* como jabón o detergente por su alta cantidad de ácidos grasos saponificables que indican la presencia de triglicéridos.

En el extracto lipídico de desecho de Tenebrio molitor no se detectó autooxidación a tiempo cero y temperatura ambiente, siendo necesario estudios que determinen el índice de peróxidos a distintas temperaturas y con diferentes rangos de tiempo.

En general se obtuvo un extracto lipídico con muy buenas características siendo el índice tanto de acidez como de refracción bastante similares que los aceites comestibles comunes y productos obtenidos de origen animal.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Birgit A., K. & Schluter R. O., "Nutritional composition and safety aspects of edible insects", Molecular Nutrition Food Research, Vol. 57, No. 5, p. 802-823, 2013.

[2] Stoops J., Crauwels S., Waud M., Claes J., Lievens B. & Van Campenhout L., "Microbial community assessment of mealworm larvae (Tenebrio molitor) and grasshoppers (Locusta migratoria migratorioides) sold for human consumption", Journal of Food Microbiology, Vol. 53, No. part B, p. 122–127, 2016.

http://www.fao.org/forestry/edibleinsects/en/ Shelomi M. "Why we still don't eat ins

gh a diffusion of innovations framework"journal of Trends in Food Science & Technology, Vol. 45, No. 2, p. 311–318, 2015.

[5] http://www.fao.org/docrep/018/i3264s/i3264s00.pdf

[6] Valdez Pantoja C. & Untiveros Bermúdez G., "Extracción y caracterización del aceite de las larvas del Tenebrio molitor", Sociedad de Química del Perú, Vol.76, No.4, 2010.

[7] http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-110-1999.PDF 18/Sep.17

[8] http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-010-1982.PDF 18/Sep.17

[9] http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-109-1982.PDF 13/Sep./2017

[10] http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-030-1985.PDF 13/Sep./2017

[11] http://aniame.com/mx/wp-content/uploads/Normatividad/CTNNIAGS/NMX-F 161-SCFI-2007.pdf, 13/Sep./2017

[12] http://aniame.com/mx/wp-content/uploads/Normatividad/CTNNIAGS/NMX-F 475-SCFI-2005.pdf, 12/Sep./2017

[13] http://aniame.com/mx/wp-content/uploads/Normatividad/CTNNIAGS/NMX-F 265-SCFI-2005.pdf, 12/Sep./2017

[14] http://www.oleaginosas.org/archivos/nmx-f-252-scfi 05[1]%20Norma%20Aceite%20soya.pdf, 12/Sep./2017. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA (PGPR) FROM THE RHIZOSPHERE OF MAIZE (*Zea mays L.*) WITH POTENTIAL TO BE USED AS BIOFERTILIZERS

ESTUDIO DEL EFECTO DEL CAMPO ELECTRICO SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE ALBUMINA DE HUEVO.

[1]Osorno J.J., [1]Castorena J.H., [2]Robles dlT. R.R., [2]*Robles L.M.R.

1. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala
2. Instituto Politécnico Nacional, CIBA-IPN unidad Tlaxcala.

*Autor para correspondencia: mreynarobles@yahoo.com

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN
El efecto del campo eléctrico sobre alimentos ha sido estudiado con diversos fines, desde la generación de sabores y olores característicos de la maduración de quesos y vinos, así como para disminuir cargas microbianas o cambios en las actividades enzimáticas. El presente estudio se realizó para evaluar cambios en la funcionalidad de albumina de huevo como respuesta a la exposición a campos eléctricos con diferente tiempo y frecuencia, encontrando cambios significativos en la solubilidad, capacidad emulgente y rendimiento de espuma con relación a una muestra de albumina sin tratar. Estos resultados dan la pauta para continuar estudiando esta tecnología e impulsar su uso en la industria alimentaria.

Palabras clave: Campo eléctrico; ovoalbúmina; propiedades funcionales; tecnologías no térmicas

INTRODUCCIÓN

Una de las preocupaciones del ser humano es satisfacer la demanda de alimentos, por lo que se han generado diversos métodos para prolongar la vida útil de los mismos. Los primeros métodos fueron empíricos, como el secado, pero con el paso del tiempo se fueron transformando en tecnologías que hasta la fecha se continúan estudiándose, adaptándose y optimizándose, de esta forma a inicio del siglo XX nace por ejemplo una tecnología para conservar leche haciendo pasar energía eléctrica atreves del producto para la generación de calor (calentamiento óhmico), y la producción de reacciones electroquímicas que disminuyen la carga microbiana, este proceso posteriormente entró en desuso en los años cincuenta por la aparición de nuevos procesos, como la pasteurización.

Un sistema parecido al calentamiento óhmico ha sido patentado por diferentes países y es conocido como Campo Electromagnético Pulsado, (CEP), la característica de este sistema es la de producir descargas eléctricas de alto voltaje, por periodos muy cortos, produce solamente incrementos de temperatura bajos comparado con el calentamiento óhmico; esta metodología despertó interés a finales del siglo 20 en la industria de los alimentos por no incrementar la temperatura y no provoca cambios drásticos en los alimentos, también es considerada una tecnología emergente. Esta tecnología se ha usado para la inactivación de enzimas y disminución de carga microbiana, principalmente en alimentos líquidos, aunque también se ha usado para la electroporación de células, es decir, la formación de poros en células, la técnica es usada de manera rutinaria en el área de biología molecular para intercambiar material genético con el exterior de un célula, usualmente para introducir ADN ajeno a una célula, a

nivel de investigación, también es usada para facilitar la extracción de material intracelular de por ejemplo colorantes, o para mejorar el secado al facilitar la extracción de agua. [1] [2].

En las últimas décadas se han generado nuevas investigaciones usando solamente el efecto de un campo eléctrico sobre los alimentos con la finalidad de consérvalos, esta tecnología se le ha denominado de campo eléctrico, (CE), o de campo electrostático. Después de numerosas investigaciones se ha demostrado que bajo ciertas condiciones de voltaje, frecuencia y tiempo de aplicación, el campo eléctrico también es capaz de disminuir cargas microbianas contaminantes o disminuir la actividad de algunas enzimas. Algunos trabajos se han enfocado a estudiar su aplicación en jugos, con la finalidad de consérvalos desde el punto de vista funcional, también se ha aplicado para disminuir el tiempo de maduración de vinos o bien para prolongar la vida útil de frutos frescos sin dañar las características antioxidantes de los productos tratados, obtenido en todas las aplicaciones resultados prometedores para que la tecnóloga sea usada en la industria.

Esta tecnología tiene varias ventajas comparada con la CEP o con el tratamiento óhmico, una de ellas es la eficiencia del uso de la energía, por lo que se reducen costo de operación, el nulo incremento de temperatura que no provoca cambios en los alimentos, además puede diseñarse para trabajar por lotes o en continuo, y que como método combinado con refrigeración presenta excelentes resultados. [3], [4]. Para generar un campo eléctrico de alto voltaje, se requiere una fuente de poder, un banco de capacitores para elevar el voltaje, un interruptor para descargar el capacitor, una cámara de tratamiento con dos electrodos metálicos entre los cuales se genera el campo y uno de estos electrodos puede funcionar como soporte para colocar el producto a tratar, sin que exista contacto entre la muestra y ambos electrodos. [4] [5] [6].

Al ser una tecnología relativamente nueva es necesario realizar evaluaciones de los efectos que tiene el CE sobre los diversos componentes de los alimentos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del CE variando el tiempo de exposición, y la frecuencia de cambio de polaridad de los electrodos, sobre algunas propiedades funcionales de la albúmina de huevo, con la finalidad de encontrar parámetros que propicien en la proteína una funcionalidad diferente a la encontrada de forma natural. Por lo anterior se trató con CE muestras de albumina de huevo en solución acuosa y posteriormente se midieron los parámetros de solubilidad, capacidad emulgente y capacidad espumante encontrando que si es posible lograr cambios en esta proteína al exponerla a un campo eléctrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se preparó una disolución acuosa de Albumina al 1% para cada experimento en agua desmineralizada y des ionizada, se agito suavemente, una alícuota fue tratada y otra fue usada como testigo para cada uno de parámetros de funcionalidad medidos. Cada tratamiento se realzó por duplicado, las determinaciones de formación de espuma se realizaron por cuatro repeticiones, las determinaciones de capacidad emulgente y solubilidad por triplicado.

Descripción del equipo

Para los tratamientos se utilizó un equipo que fue diseñado y construido en el CIBA-IPN, el cual consta de 4 partes principales: a) Fuente de alto voltaje con panel de control, (Dieléctrica Test Set, Megger ®), que recibe 110 V de AC y puede dar voltajes de cero a 60 kV DC, b) Generador de funciones con rango

de 0 Hz a 5 MHz, el cual permite cambiar las frecuencias en los tratamientos, y c) un Osciloscopio digital marca Tektronic, TDS 1001 B con 2 canales, para caracterizar la onda de trabajo.

Tratamiento con Campo Eléctrico

Se colocaron 40 ml de la solución acuosa de Ovoalbúmina en la base de una caja de Petri de vidrio la cual se situó sobre uno de los electros, el otro electrodo fue colocado sobre el borde superior de la caja, de tal forma que la muestra queda en medio de ambos electrodos sin tocar ninguno de ellos. Todos los tratamientos fueron de 10.5 kV/cm, y los tiempos de aplicación del campo fueron de 5, 15 y 30 min y la frecuencia de 0, 60, 120, 240, 480 y 960 Hz. Cada tratamiento se realizó por duplicado contando cada uno con una muestra sin tratar (testigo).

Se realizaron 54 tratamientos, todas las muestras (tratadas y testigo), fueron diluidas posteriormente en pH 3, 7, y 10, para cuantificar las variables de respuesta por triplicado, o con 4 repeticiones dependiendo de la sensibilidad de cada prueba. Las pruebas que se realizaron fueron determinación de solubilidad, capacidad espumante, capacidad emulgente y estabilidad de la emulsión.

Determinación de Solubilidad

El índice de solubilidad (IS), se determinó a diferentes valores de pH, [7]. Se prepararon 10 ml a partir de las disoluciones de proteína, para obtener una concentración de 0.2% con buffer de fosfatos 0.1 M a pH 3, 5, 7 y 10. Se colocaron las muestras (por triplicado) en agitador orbital (SEV), dentro de una cámara con temperatura controlada de 35°C durante 30 minutos, posteriormente se centrifugaron en ultracentrífuga refrigerada (Eppendorf AG), a 10,000 rpm, durante 30 min a 20°C. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 1000 µL y se diluyeron en 4 ml del buffer correspondiente. Para cuantificar el contenido de proteína por absorbancia a 250 nm, se empleó un espectrofotómetro (Hewelett Packard).

$$Solubilidad\ (\%) = \frac{proteína\ sobrenadante}{proteina\ total\ en\ la\ muestra}\ x\ 100$$

Determinación de la capacidad emulgente

Se realizó según el método de turbidemetría referido por Rodiles-López (2008). [7]. Las muestras se diluyeron para tener 30 ml de una concentración v/v al 0.5% de proteínas en cada uno de los buffer a pH 3, 5, 7 y 10; a 30 ml de cada solución proteica se adicionaron 10 ml de aceite de maíz, se agitó con homogeneizador (Spencer Scientific) durante 30 s, al final de la agitación se tomó una alícuota de la emulsión de 20 µL y se diluyó en 5 ml de SDS al 0.1%, se leyó su absorbancia a 500 nm, el resultado se reporta como capacidad emulgente (*ECm*) y se calcula con:

$$T_b = \frac{2.303\ x\ A}{l}$$

$$Capacidad\ Emulgente = \frac{2\,x\,T_b}{\phi\,x\,C}$$

Dónde: T_b = transmitancia, A= absorbancia, l la longitud de la celda, ø el volumen en ml de la fracción oleosa, C es la concentración en % de proteínas. Las unidades de CEm se reportan como (cm^2g^{-1}).

La estabilidad de la emulsión (*EE*), se realiza tomando otra alícuota bajo las mismas condiciones que la anterior a los 10 minutos después de obtenida la emulsión y se calcula con:

$$EE = \frac{T - \Delta t}{\Delta T_b}$$

Donde: ΔT_b turbidez inicial, Δt el cambio en relación al tiempo y T turbidez final.

Capacidad de formación de espuma

La capacidad de formación espumante (*CfE*) de las muestras fueron determinados por el método de Kato *et al*., (1983), se colocó 10 ml de albumina al 0.1% en búfer de fosfato de 0,1 M (pH 3, 5, 7 y 10), en un tubo de vidrio graduado, (2.4 cm de diámetro y 30 cm), por donde se introduce aire con una presión de 2 psi con una bomba de vacío (Felisa), durante 15 s; se mide el volumen de la espuma formada en cm^3, los resultados se calculan con la fórmula. [7].

$$Capacidad\ \ formación\ Espuma\ \ (\%) = \frac{volumen\ \ final}{volumen\ inicial}\ x\ 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los gráficos que se presentan en las siguientes figuras representan los resultados normalizados como cocientes (muestra tratada / muestra testigo), obtenidos con los diferentes tratamientos, para cada una de las propiedades funcionales, de tal forma que valores cercanos a la unidad indica que no hay cambios provocados por efecto del CE. Valores menores de 1 indican una disminución en la propiedad evaluada y mayores de uno indican que se aumentó esa funcionalidad, los gráficos se presentan en las siguientes Figuras con los diferentes valores de pH, cada grafico pertenece a los resultados del efecto del CE relacionada con el tiempo de tratamiento *vs* frecuencia.

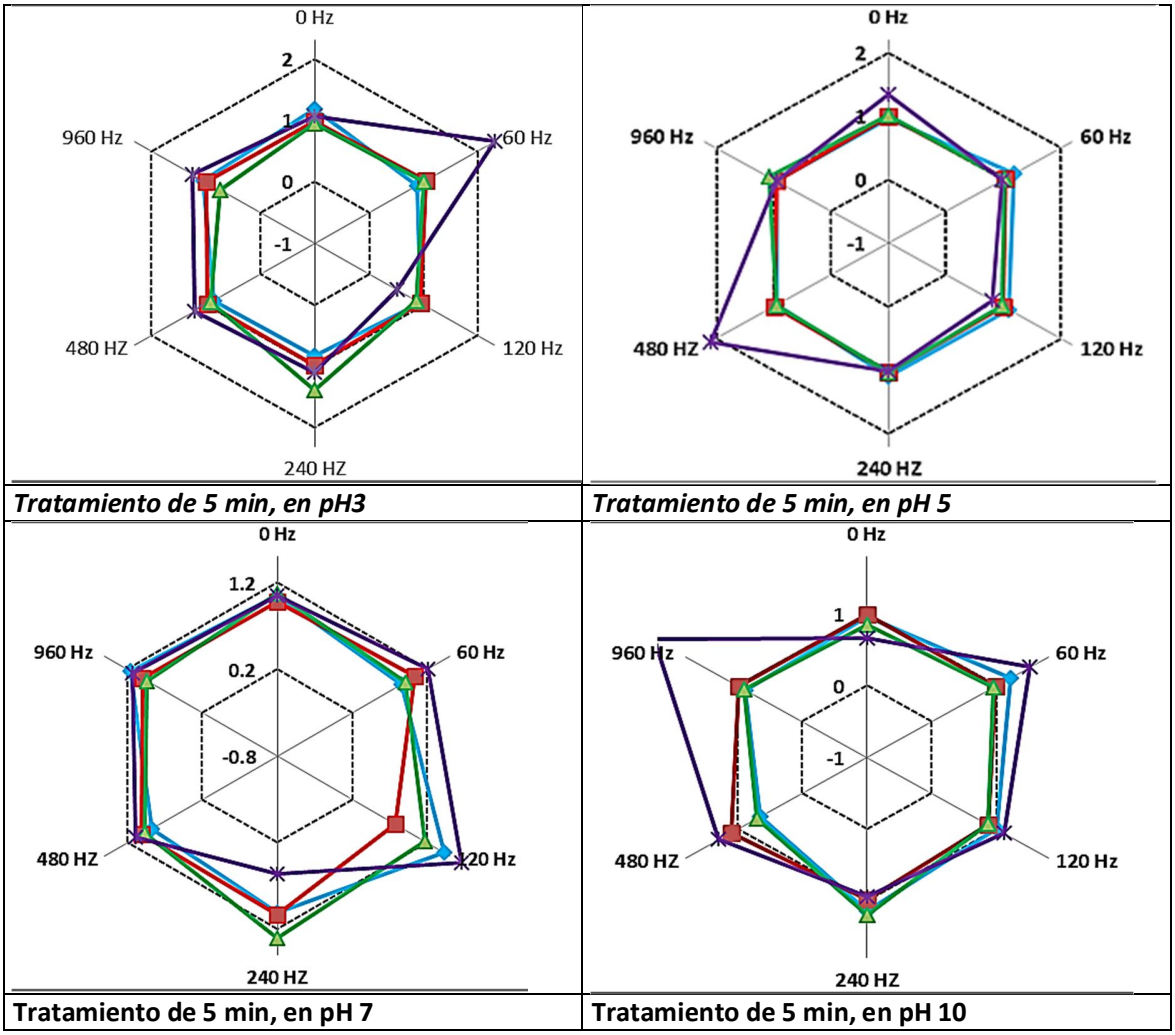
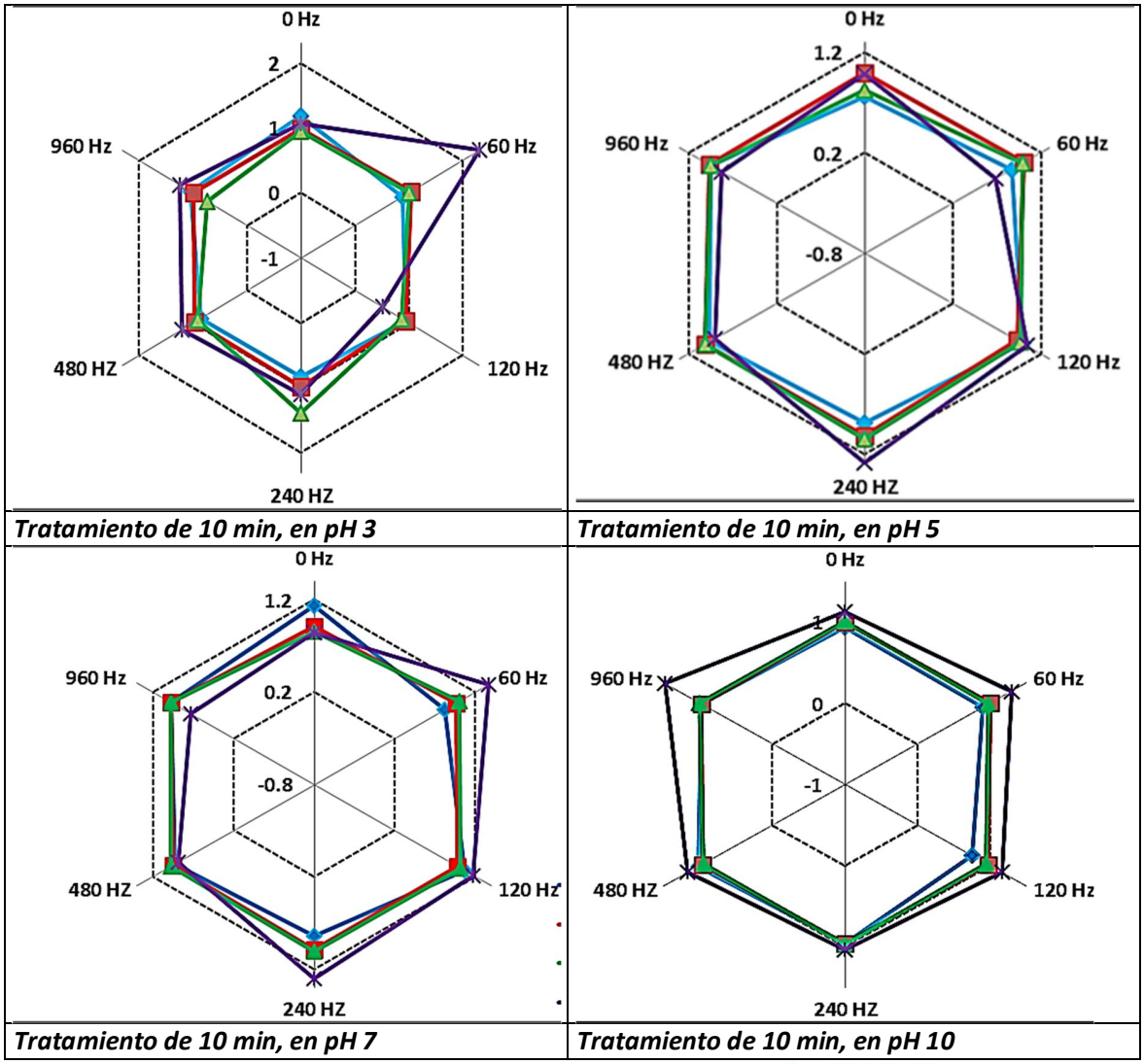


Figura 1. Efecto del tiempo de 5 min con diferentes frecuencias de CE en las propiedades funcionales de la ovoalbúmina, disuelta en diferentes pH.

Es posible observar que la propiedad funcional que más es afectada por el CE es la solubilidad con la mayoría de las frecuencias y en los diferentes pHs probados, comparadas con la muestra testigo, sin

embargo no se encuentra una correlación entre la respuesta de la proteína hacia el pH donde se solubiliza después del tratamiento, es posible que se afecten las interacciones electrostáticas con la exposición al CE, similar a lo reportado por Zhong et al., (2005). [8]

En la Figura 2, se presentan los resultados de 10 min de tratamiento, con voltaje contante y frecuencias de 0, 60, 120, 480, 960 Hz y su posterior disolución en diferentes pH. Aquellos gráficos que muestran figuras concéntricas indican que los cambios son tan pequeños que no se deforma la figura geométrica.



Tratamiento de 10 min, en pH 3 | *Tratamiento de 10 min, en pH 5*

Tratamiento de 10 min, en pH 7 | *Tratamiento de 10 min, en pH 10*

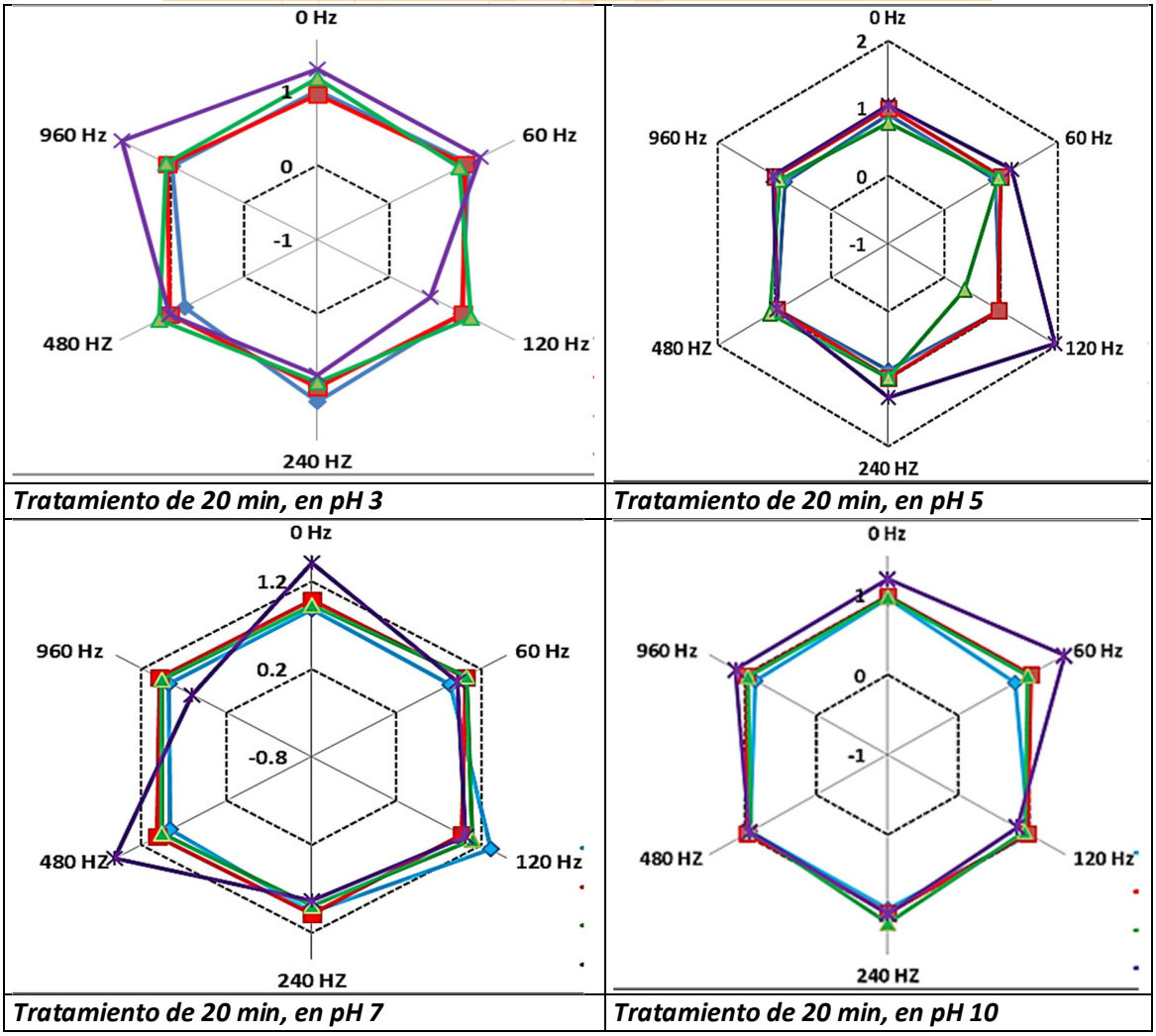
Figura 2. Efecto del tiempo de 10 min con diferentes frecuencias de CE en las propiedades funcionales de la ovoalbúmina, disuelta en diferentes pH.

En los gráficos de la Figura 2 también es posible observar que el parámetro que mayormente cambió por efecto del CE fue la solubilidad, aumentando principalmente en pH 3, al ser tratadas a 60 Hz y 960Hz por 10 min, es importante señalar que la solubilidad de las proteínas en general tiende a disminuir en pH 3, sin embargo en este caso aumenta. Arzeni (2016), señala que Takayuki et al., (1997) encontraron que el tratamiento con campo eléctrico inactivaba células pero al no incrementar la temperatura de leche, la proteína de la misma no sufría desnaturalización, en nuestro caso se observan cambios funcionales en algunas de las condiciones probadas. [9]

La ovoalbúmina es una de las proteínas más usadas en la industria alimentaria por la capacidad de retener agua, formar espumas, y geles, interaccionar con lípidos, el punto isoeléctrico de la ovoalbúmina es de pH 4.5, [9]

Los gráficos de la Figura 3, representan los efectos del CE que se producen con tratamiento de 20 min, y su efecto al ser solubilizadas en diferentes pHs. Es importante señalar que en pH 5, la solubilidad con la frecuencia de 120 Hz se duplica y por lo tanto la formación de emulsiones se ve disminuida, se observa que bajo un mismo pH y variando los tiempos de exposición de las muestras a los campos eléctricos, la capacidad de formación de espuma fue la que presentó menos cambios, esto podría indicar que es posible provocar alteraciones en las interacciones entre los aminoácidos y que provocan la formación de estructuras denominadas glóbulos fundido, haciendo que varié la solubilidad, en pH 3 hay posibilidades de encontrar la formación de precipitados debido al punto isoeléctrico de la albumina, obviamente se mostraría una disminución en la solubilidad, pero con tratamiento de 960 Hz por 30 min. Tang y colaboradores (2009), estudiaron los agregados formados en proteína de soya que se formaron durante tratamiento con ultrasonido, y la capacidad funcional para formar geles mejoró. [10]

En cuanto a la capacidad emulgente y la estabilidad de la emulsión no se presentan cambios tan marcados o significativos ($Pv \leq 0.001$).



Tratamiento de 20 min, en pH 3

Tratamiento de 20 min, en pH 5

Tratamiento de 20 min, en pH 7

Tratamiento de 20 min, en pH 10

Figura 3. Efecto del tiempo de 20 min con diferentes frecuencias de CE en las propiedades funcionales de la ovoalbúmina, disuelta en diferentes pH

Uno de los objetivos de evaluar la funcionalidad de la ovoalbúmina en diferentes pH, era precisamente comprobar que efectivamente, el medio provoca cambios "*per-se*", como producto de la interacción entre el CE y la proteínas, existiendo diferencias entre el comportamiento de las muestras tratadas con relación a las muestras testigo, la mayoría de investigaciones relacionadas con esta tecnología se ha basa principalmente en el efecto de productos cárnicos congelados, la conservación de frutos pos cosecha y en secado, principalmente, [12], pero existe muy poca información sobre los efectos funcionales provocados en proteínas específicamente. [11],[12],[13]

La importancia de los resultados encontrados es que con pH entre 5 y 3, debido al punto isoeléctrico de la proteína con algunos tratamientos no se presipito, sino que al contrario la solubilidad aumento, siendo esto un beneficio para la indstria alimentaria ya que la mayoría de alimentos son ácidos.

En el caso específico de solubilidad en pH10 se encontró que la solubilidad aumento principalmente con 30 minutos de exposición, y 120 Hz de frecuencia, este resultado es importante porque de manera general la solubilidad de las proteínas baja en pH alcalino, y no presenta cambios significativos en la otras propiedades funcionalidades.

CONCLUSIONES

Se concluye que es posible realizar modificaciones en la estructuras secundaria y terciaria de la proteína y que éstas se vean reflejadas en las características funcionales de la misma, al ser tratadas con diferentes variables del campo eléctrico, además, dependiendo del medio donde se disuelva la proteína el comportamiento puede dirigirse para tener una propiedad funcional mejorada. De los resultados se destaca que el mejor tiempo de tratamiento es de 5 min a una frecuencia de 60 Hz ya que la solubilidad, la capacidad emulgente, la estabilidad y la capacidad espumante registraron sus mejores valores. Para poder aplicar esta tecnología a nivel industrial, donde en ocasiones se requieren ingredientes con determinadas propiedades funcionales, se recomienda continuar con esta línea de investigación ya que además de novedosa tiene un gran potencial tecnológico.

REFERENCIAS

[1] Barbosa-Cánovas, GV, Pothakamury, UR., Palou, E, Swanson, BG. « High intensity pulsed electric fields: Processing equipment and design,» En: Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker, Inc., pp. 53-112, 1998.

[2] Butz P. and Tauscher B. "Emerging technologies: chemical aspects". Food Research International.35, 279–284. 2014

[3] Shigeo Aibara and Kimiko Esaki. "Effects of high-Voltage Electric Field Treatmment on Bread Starch". Biosci. Biotechnol,Biochem., 62(11), 2194-2198. 1998.

[4] Yu Wang, Baogang Wang and Lite Li. "Keeping quality of tomato fruit high electrostatic field pretreatment during storage". Journal of the Science of Food Agriculture. 88:464-470. 2008

[5] Robles-López M.R. Robles de le Torre R.R, Camarillo Cadena M., Hermández Arana A, Hernández Sánchez H. "Efecto de los campos eléctricos pulsantes sobre la alfa- Lactoalbumina Bovina". Rev. Mex. de Ing. Quim. 11,(3), 373-382. 2012

[6] Shigeo Aibara and Kimiko Esaki. "Effects of high-Voltage Electric Field Treatmment on Bread Starch". Biosci. Biotechnol,Biochem., 62(11), 2194-2198. 1998

[7] Rodiles-López, J.O., Jaramillo-Flores, M.E., Gutérrez-López, G.F., Hernández-Arana, A. Fosado-Quiroz, R.E., Barbosa-Cánovas, G.V. y Hernández-Sánchez, H. "Effect of high hydrostatic pressure on bovine α-lactalbumin functional properties". Journal of Food Engineering 87, 363-370. 2008.

[8] Zhong K., Hu X., Guanghua Z., Chen F. and Liao X. "Inactivation and conformational change of horseradish peroxidase induced by pulsed electric field". Food Chemistry. 92, 473–479. 2005

[9] Arzeni Carolina. "Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico". Tesis doctoral Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial . 2016.

[10] Tang, C.-H., Wang, X.-Y., Yang, X.-Q., & Li, L. "Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties". Journal of Food Engineering, 92(4), 432-437. 2009

[11] Dalvi -Isfahana Mohsen, Hamdami Nasser. "The principles of high voltage electric field and its application in food processing: A review" Food Research International. (89), 48–62. 2016

[12] Bajgai, T.R., Hashinaga, F., Osobe, S., Raghavan, G.S.V., and Ngadi M.O. "Application of high electric field. (HEF) on the shelf-life extension of emblic fruit (Phyllanthi emebelica L.)". Journal of Food Engineering, 74: 308-313. 2006

[13] Chang-Wei Hsieh, Wen-Ching Ko. "Effect of high-voltage electrostatic field on quality of carrot juice during refrigeration". Food Science Technology. 41: 1752-1757. http://dx.doi.org/10.1016/j. compchemeng.2016.11.044. 2008

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE UNA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA ADICIONADA CON EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*).

Vera-Soto, A., Ramírez-Godínez, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Añorve-Morga, J. y *González-Olivares, L.G.

Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

*Autor para correspondencia: lggonzalez@uaeh.edu.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

El deterioro de la salud está estrechamente relacionado con el estrés oxidativo. Para contener esta problemática, la ciencia de alimentos desarrolla procesos de elaboración de productos con ingredientes antioxidantes, como los fenoles de origen vegetal y péptidos derivados de hidrólisis de proteínas. Así, se han integrado a procesos de fermentación láctica ingredientes como el jengibre (Zingiber officinale) que es un condimento, pero al que se atribuyen diversas propiedades benéficas para la salud, tales como sus propiedades antioxidantes [1]. Al mismo tiempo, la fermentación de la leche es un proceso que permite la liberación de péptidos con capacidad antioxidante [2], dada cuando las bacterias ácido lácticas hidrolizan las proteínas. Por ello este trabajo consistió en desarrollar una bebida láctea fermentada con extracto de jengibre para determinar si existe sinergismo entre los compuestos que les aportan actividad antioxidante, así como evaluar su posible aceptación en el mercado. Para ello se hicieron extractos acuosos de jengibre a 90ºC por 15 min y a 55ºC por 5 minutos. La leche fermentada se realizó con extracto de jengibre e inoculando leche con Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus (al 1%). Se realizaron pruebas de ordenamiento a 30 jueces semientrenados para evaluar la concentración de jengibre que se adicionó a la bebida. Posteriormente se realizó una prueba hedónica a 100 jueces no entrenados. Se determinó el contenido de fenoles totales así como la actividad antioxidante por los métodos de FRAP, ABTS y DPPH. No se encontró diferencia significativa en el sabor de la bebida adicionada con jengibre, ni por el método de extracción ni por la concentración de jengibre. Los valores de aceptación en la prueba hedónica del producto (escala de 1 a 5), estuvieron por encima de la media, 3.23 para sabor y 3.75 para textura. La actividad antioxidante de las bebidas frente a los radicales ABTS y DPPH, no tuvieron diferencia significativa con las bebidas sin extracto. Sin embargo, para la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} en la prueba FRAP se observó diferencia significativa. La actividad antioxidante de la bebida con extracto aumentó frente a las no fermentadas con y sin extracto. Además, el contenido de fenoles totales aumentó al adicionar el extracto de jengibre en ambas bebidas, pero en la bebida con el extracto hubo mayor contenido de fenoles que la que no lo contenían, esto indica que los fenoles son los responsables de la actividad antioxidante frente al Fe^{3+}.

Palabras clave: Cerveza; Leche fermentada; actividad antioxidante; jengibre; alimento funcional.

REFERENCIAS

[1] Atahak, S., Peeri, M., Azarbayjani, M., & Stannard, S. (2014). Effects of ginger (Zingiber officinale Roscoe) supplementation and resistance training on some blood oxidative stress markers in obese men. Journal of Exercise Science & itness, 12, 26-30.

[2] Lui, J., Chen, M., & Lin, C. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir. Agric Food Chem, 53, 2467-2474.

DETERIORO DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) ALMACENADO A TEMPERATURAS Y HUMEDADES ALTAS.

[1]Sampayo-Hernández, M.A., [1*]Torres-Tapia, M.A., [1]Vázquez-Badillo, M.E., y [2]Zamora-Villa, V.M.

1. Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. CP. 25315
2. Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. CP. 25315.

*Autor para correspondencia: atorres_tapia@hotmail.com

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN

Uno de los aspectos importantes en el manejo de semillas es el almacenamiento, ya que generalmente permanece por un periodo de tiempo almacenada antes ante su comercialización [1]. El objetivo primordial del almacenamiento es mantener las semillas viables en buena condición física y fisiológica, desde su cosecha hasta la próxima siembra, para logar una germinación y emergencia satisfactoria [2]. El presente estudio se realizó para conocer los efectos de la humedad y la temperatura alta sobre la fisiología y sanidad de la semilla de frijol mediante pruebas de laboratorio. Almacenada durante 15 días a una humedad relativa de 75% y humedad de la semillas de 16% a 40°C, semillas con y sin tratamiento. Se muestreo cada 3 días obteniendo 6 muestras al finalizar el periodo, se le evaluó la germinación(plántulas normales, plántulas anormales y semillas sin germinar), longitud media de vástago, radícula y peso seco a los nueve días, a los diez días se evaluó la sanidad de la semilla para lo cual se sembró semilla en malta sal agar. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y la interacción tiempo-tratamiento para las variables fisiológicas a excepción de la longitud medias de radícula quien tuvo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. En el tiempo de almacenamiento hubo una reducción de la germinación del día 0 al día 15 de 25%, las plántulas normales aumentaron 20%, los porcentajes de semillas sin germinar fueron bajos y en los distintos periodos tiempo de almacenamiento las diferencias fueron significativas estadísticamente. Las longitud de vástago y radícula tuvieron diferencias estadísticas significativas pero con un comportamiento positivo y en el peso seco se mantuvo constante siendo estadísticamente igual entre tiempos de almacenamiento y entre tratamientos y en la interacción entre estos dos. La incidencia de hongos fue mayor en semillas sin tratamiento y con mayor humedad debido a que hubo variaciones en la humedad, para los días 0, 6, y 12. Esto nos indica que la humedad y la temperatura alta tienen un efecto negativo sobre la fisiología y la sanidad de la semilla.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris,* temperatura, humedad, deterioro, fisiología, sanidad de semillas.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los granos básicos después del maíz de mayor consumo en la dieta del mexicano. Lo que implica un requerimiento de semilla de la más alta calidad como insumo en un programa de producción para obtener rendimientos altos y poder así cubrir la demanda de los consumidores. La semilla se enfrenta a diversos factores desde su madurez fisiológica hasta que llega a

los productores para su siembra, en este transcurso, sufre deterioro y se ve afectada su calidad tanto física como fisiológica.

Uno de los aspectos importantes para su manejo es el almacenamiento, ya que la semilla generalmente permanece por un periodo de tiempo almacenada [1]. El objetivo primordial del almacenamiento es mantener las semillas viables en buena condición física y fisiológica, desde su cosecha hasta la próxima siembra, para logar una germinación y emergencia satisfactoria [2]. Para un buen almacenamiento es necesario contar con condiciones idóneas de humedad y temperatura, factores considerados los más importantes en la conservación de las semillas, ya que permiten mantener su calidad de la semilla por más tiempo; que al contrario, a niveles altos o inadecuados pueden conducir al deterioro acelerado de granos y semillas [3].

El deterioro causado es a nivel bioquímico, se manifiesta en la pérdida de vigor y potencial germinativo de las semillas, lo que provoca una disminución en su valor económico, estudiado en diversos cultivos; se han realizado estudios sobre el efecto del envejecimiento artificial sobre la germinación de semillas de maíz, donde se encontraron que la humedad y temperatura tienen un efecto negativo sobre la calidad de la semilla, en mayor proporción la humedad que la temperatura [4]. Otros estudios han determinado el efecto del envejecimiento acelerado en semillas de variedades criollas como el maíz azul, generando porcentajes muy bajos de germinación y un aumento en plántulas normales y semillas sin germinar marcando el deterioro que sufre la semilla al estar expuesta a temperaturas y humedades relativas altas [5].

A pesar del conocimiento sobre los efectos de la humedad y temperatura en la semilla, aún existe un deficiente control de estos factores durante el almacenamiento comercial de semillas, provocando pérdidas durante esta etapa debido a que influyen directamente sobre la fisiología de la semilla ocasionando deterioros en cortos periodos de tiempo, además de beneficiar el desarrollo tanto de microorganismos como hongos e insectos causando un deterioro mayor.

El deterioro es un proceso que involucra la interacción de factores intrínsecos de la semilla con factores externos [6]. Para poder tener un control sobre ellos deben realizarse estudios para ver cuáles son los rangos de humedad y temperatura que causa mayor efecto negativo a las semillas durante el almacenamiento.

El daño que ocasiona el almacenamiento en condiciones adversas se evalúa mediante diferentes parámetros como lo es la calidad fisiológica y sanitaria de la semilla ya que la presencia de hongos influye a que el deterioro sea aún mayor y debemos conocer la incidencia causada por este tipo de microorganismos, además de ser un indicador de las condiciones a las que han sido almacenados los lotes de semilla. Por tal motivo, el presente trabajo fue evaluar el nivel de deterioro causado en la semilla de frijol dado por las diferentes condiciones de humedad y temperatura mediante pruebas de la calidad fisiológica y sanitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudió, se llevó a cabo en el Laboratorio de Ensayo de Semillas del CCDTS, de la UAAAN N, ubicada en Saltillo, Coahuila, México; Se evaluaron semillas de Frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) variedad Pinto saltillo.

Metodología y tratamientos

El experimento consistió en almacenar semillas con un contenido de humedad de 16% tratadas con un fungicida (Captan, CT) y sin tratar (ST), en un ambiente artificial a una temperatura de 40°C y una humedad relativa de 75%; en un periodo de almacenamiento de 15 días, haciendo muestreos cada tres días iniciando en el día 0, 3, 6, 9, 12, hasta el día 15, teniendo un total de seis muestreos.

Para hacer el ajuste de humedad en la semilla a 16%, de humedad, se determinó el contenido de humedad inicial mediante un determinador de humedad "Motomco", se realizó el ajuste de humedad utilizando 750 gr de semilla, para el CT se aplicó Captan al 50% (1.5 gr) en el agua requerida para el ajuste de humedad y se homogenizó la semilla; mientras que para el ST, solo se agregó la cantidad de agua requerida. Se acondicionaron ambos tratamientos por 24 horas a una temperatura de 10ºC (refrigerador) en frascos de vidrio.

Posteriormente, la semilla de los tratamientos se colocaron en vasos con orificios para permitir un equilibrio osmótico entre la semilla y las condiciones ambientales creadas artificialmente, las cuales se dieron adaptando una charola con agua saturada con cloruro de sodio (NaCl) al 75% recomendado [7], creando una humedad relativa ambiental de 65%, con una temperatura de 40°C.

Así mismo, en cada muestreo se determinó el contenido de humedad por método directo mediante una estufa a temperatura alta constante a 130°C por una hora, en tres repeticiones de semilla de cada tratamiento, pesando la semilla antes y después del secado.

Variables evaluadas

Se evaluaron la calidad fisiológica, mediante las normas establecidas por la International Seed Testing Association [8]; la calidad sanitaria, mediante siembra en medio de cultivo Malta Sal Agar (MSA) en condiciones asépticas para evitar contaminación.

Para determinar la calidad fisiológica, se consideraron las variables Plántulas Normales (PN), Plántulas Anormales (PA), Semillas sin Germinar (SSG), Longitud Media de Vástago (LMV), Longitud Media de Radícula (LMR) y Peso Seco (PS), sembrando tres repeticiones de 25 semillas por tratamiento, llevando a una germinación bajo condiciones de 25ºC con 8 horas luz y 16 horas de oscuridad durante 9 días, en una germinadora marca Seedburo Germinator. Mientras que para la calidad sanitaria, se determinó mediante el porcentaje de semillas infectadas por hongos y semillas sanas; primeramente el tratamiento CT, las semillas se lavaron con tween 20 para eliminar tratamiento; en seguida las semillas de ambos tratamientos fueron desinfestadas superficialmente con hipoclorito al 2%, en seguida se sembraron tres repeticiones de 10 semillas por tratamiento en cada caja Petri con el medio de cultivo (MSA), y se colocaron en condiciones de 27°C óptimas para el desarrollo de hongos dejándolas por diez días. Al finalizar los tiempos establecidos para cada prueba se evaluaron cada una de las variables.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones, bajo un arreglo factorial, considerando como factores principales el tiempo y el tratamiento utilizando, la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de tukey con un alfa de 0.5%, en el programa estadístico SAS versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los análisis de varianza, en plántulas normales en tratamientos no se encontraron diferencias significativas, así como en el contenido de humedad, plántulas normales, plántulas anormales, semillas sin germinar, longitud media de vástago y peso seco, sin embargo, se encontraron diferencias altamente significativas en longitud media de radícula (Cuadro 1).

En los diferentes muestreos se encontraron diferencias altamente significativas en el contenido de humedad, plántulas normales, plántulas anormales, longitud media de vástago, diferencia significativa en las variables semillas sin germinar y longitud media de radícula; mientras que en peso seco no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 1).

En la interacción tiempo por tratamiento no se encontraron diferencias en ninguna de las variables evaluadas excepto en longitud media de radícula se encontró diferencia significativa, Cuadro 1.

Cuadro 1. Cuadrados medios del contenido de humedad y las variables fisiológicas

FV	GL	CH (%)	PN (%)	PA (%)	SSG (%)	LMV (cm)	LMR (cm)	PS (ml/pl)
TRAT	11	0.2	0.4	0.0	0.0	0.4	51.4**	0.6
TIEM	5	12.6**	898.93**	542.57**	5.5*	36.1**	19.3*	201.8
TIEM*TRAT	5	0.7	221.2	238.9	0.2	8.8	4.6*	131.2
Error	24	0.4	97.8	59.1	1.4	2.0	3.0	229.3
CV		4.8	14.5	29.8	54.4	7.3	7.8	11.0

FV=fuente de variación, GL=grados de libertad, CH=contenido de humedad, PA=plántulas anormales, SSG=semillas sin germinar, LMV= longitud media de vástago, LMR=longitud media de radícula, PS=peso seco.

El contenido de humedad disminuyo durante el periodo de tiempo de almacenamiento de 16% a 12.2%, Cuadro 2. Esto pudo influir en que el deterioro no fuera mayor y no se viera reflejado en algunas variables, la humedad es la que más influencia tiene sobre el deterioro [4]. En plántulas normales se observó que ya en un principio la semilla tenía un grado de deterioro obteniendo plántulas normales menor a 85% y a partir de ahí el porcentaje de plántulas normales disminuyo conforme aumentaron los días de almacenamiento llegando en el día 15 a 56% con una disminución de un 25% del día 0 al día 15. En la variable plántulas anormales aumentaron los porcentajes un 20% aunque en un principio ya se tenía un porcentaje considerable de plántulas anormales en los primeros 6 días de un 18%. En la variable semillas sin germinar los porcentajes fueron bajos el máximo fue menor a 4% al finalizar el periodo (Cuadro 2).

En la longitud media de vástago tuvo una tendencia positiva y en aumento, por presentar el mayor valor al día 9 y la menor al día 0, teniendo la misma respuesta en longitud media de radícula. La variable peso seco estadísticamente todos son iguales, la variación que hay entre cada periodo de tiempo no es alta, en la mayoría de los muestreos tuvieron una respuesta similar (Cuadro 2).

En la comparación de medias del tratamiento en la mayoría de las variables no hubo diferencias estadísticas a excepción de la longitud media de radícula donde se encontró que la mayor longitud de radícula se obtuvo en la semillas sin tratamiento con una diferencia de 2.3% con respecto a semillas con tratamiento.

Se menciona que el almacenamiento a diferentes condiciones de humedad y temperatura sobre semillas de algunas especies se ven afectadas en su potencial de germinación [9], así mismo, se presenta deterioro en la semilla bajo distintos métodos de almacenamiento sobre todo cuando la humedad se ve reducida bruscamente, afectando la viabilidad de la semilla, disminuyendo el número de plántulas normales, sin embargo, no tiene impacto en las anormalidades y en la presencia de hongos [10].

Cuadro 2. Comparación de medias del contenido de humedad y variables fisiológicas en semilla de frijol almacenado por diferentes periodos de tiempo a humedades y temperaturas altas.

	CH (%)		PN (%)		PA (%)		SSG (%)		LMV (cm)		LMR (cm)		PS (mg/pl)	
TIEM														
0	16.0	A	81.3	A	18.0	B	1.2	B	17.3	B	21.5	ABC	159.0	A
3	13.4	CD	80.7	A	18.0	B	0.9	B	15.4	B	24.6	A	158.5	A
6	14.6	B	75.3	AB	16.0	B	2.8	AB	20.6	A	21.0	BC	165.5	A
9	13.5	BC	62.0	BC	32.0	A	2.1	AB	22.1	A	23.9	AB	153.8	A
12	12.3	DE	54.7	C	32.7	A	2.6	AB	20.3	A	20.0	C	157.0	A
15	12.2	E	56.0	C	38.0	A	3.4	A	20.0	A	23.2	AB	148.1	A
TRAT														
CT	13.6	A	68.2	A	25.8	A	2.1	A	19.2	A	21.2	B	157.1	A
ST	13.7	A	68.4	A	25.8	A	2.2	A	19.4	A	23.6	A	156.8	A

CH=contenido de humedad, PA=plántulas anormales, SSG=semillas sin germinar, LMV= longitud media de vástago, LMR=longitud media de radícula, PS=peso seco, CT=con tratamiento, ST=sin tratamiento.

La micoflora obtenida durante el periodo de almacenamiento la mayoría son especies de *Aspergillus* obteniendo mayor porcentajes de la especie *flavus,* seguido del *níger y por ultimo ochraceus* que se encuentra con porcentaje igual que *Fusarium* y con un mejor porcentaje presente fueron especies de *Penicillium.* Los mayores porcentajes de semillas infectadas por hongos fue en el tratamiento ST con contenidos de humedad más altos en los muestreos a 0, 3 y 6 días. Sin embargo, a pesar de que en los muestreos 12 y 15 días, se tuvieron contenidos de humedad bajos, se logró presentar que mayor incidencia de hongos a los 12 días de tres especies de Aspergillus y solo 20% de semillas limpias (sanas) (Cuadro 3). El presentar mayor incidencia de hongos en la semilla es un reflejo por no contar con una protección dada por un tratamiento químico y por tener contenidos de humedad altos en la semilla [11].

Cuadro 3. Micoflora en semillas de frijol almacenadas por diferentes periodos de tiempo a humedades y temperaturas altas

		% de semillas invadidas por hongos					
			Aspergillus				
TIEM	**CH**	***Fusarium***	***flavus***	***níger***	***ochraseus***	***Penicilliu m spp.***	**Limpias**
CT							
0	16.0	0	0	0	0	3.3	96.7
3	13.4	0	0	0	0	0	100
6	14.6	0	0	0	0	0	100
9	13.5	0	0	0	0	0	100
12	12.3	0	16.67	0	0	0	83.33
15	12.2	0	0	0	0	0	100
ST							
0	16.0	0	23	20	0	21	36
3	13.4	13	20	0	0	0	67
6	14.6	13	6.66	10	0	3.3	67.04
9	13.5	0	6.66	0	0	0	93.34
12	12.3	0	27	27	26	0	20
15	12.2	0	23.33	23	0	0	53

TIEM=tiempo, CH=contenido de humedad, CT=con tratamiento, ST=sin tratamiento.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a la hipótesis se comprueba que la humedad y temperaturas altas tienen un efecto negativo en la calidad fisiológica y sanitaria de la semilla. A pesar de que las humedades de la semilla disminuyeron esta ya había sufrido un deterioro que fue irreversible reflejándose en bajos porcentajes de plántulas normales que además se fue en aumento por la presencia de hongos, principalmente en semillas sin tratamiento.

REFERENCIAS

[1] S.M. Blandón. "Evaluación de tres métodos de almacenamiento de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) y su efecto en atributos de la calidad del grano". Tesis. El Zamorano, Honduras, PP. 1, 6 y 7, 2010.

[2] J. Doria. "Generalidades sobre las semillas: su conservación y almacenamiento". Cultivos tropicales, vol.31, no.1, p 81, 2010.

[3] G.F.Pérez y V. J. M. Pita. "Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas", No. 2112. Universidad Politécnica de Madrid I.S.B.N. 84-491-0503-X - N.LP.O. 251-01-0097 Madrid, España, p16, 2001.

[4] S. F. Rincón y M. J. Molina. "Efecto del método de envejecimiento artificial sobre la germinación de semillas de maíz". Agronomía Mesoamericana 1:51-53. 1990.

[5] H.D. Duran, H.G. Gutiérrez, V.J. Arellano, R.E. García, V.J. Virgen. "Caracterización molecular y germinación de semillas de maíces criollos azules con envejecimiento acelerado". Agronomía Mesoamericana 22(1):11-20.2011. ISSN: 1021-7444, 2011.

[6] R. Alizaga. "Alteraciones fisiológicas y bioquímicas en semillas de tres cultivares de *Phaseolus vulgaris* de alto y bajo vigor inducido". Agronomía Costarricense 14(2):161-168, 1990.

[7] P.W. Winston y D.H. Bates. "Saturated solutions for tne control of humidity in biological research. Ecology, 41:232-237, 1960.

[8] ISTA. International Seed Testing Association International. "Rules For Seed Testing". Chapter 3and. ISBN 3-906549-38-0. Zurich, Suiza. 243p, 2004.

[9] V.F. Ortuño y Z.R. Echandi. "Efecto de condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad y vigor de la semilla de café (*Coffea arábica* L.)". p5. Agronom. Costarr. 4(2):149-154, 1980.

[10] T. J. Gómez, J. M. Jasso, J. H. Vargas, J. H. Soto, "Deterioro de semilla de dos procedencias de Swietenia macrophylla King., bajo distintos métodos de almacenamiento" Ra Ximhai vol. 2. número 1 Enero – Abril, pp. 223-239, 2006.

[11] Erazo, A.A. "Deterioro de calidad física y viabilidad de semillas de maíz (Zea mays), frijol (Phaseolus vulgaris), y sorgo (Sorghum bicolor) durante su almacenamiento en Zamorano". Tesis. El Zamorano, Honduras. p23, 2004

OBTENCIÓN DE AZÚCARES SIMPLES A PARTIR DE MALANGA (*Colocasia esculenta*) Y RAQUIS DE PLÁTANO MACHO (*Musa balbisiana*) POR MOLIENDA MECÁNICA.

[1]Morales-Toledo, L.I., [2]Navarro-Mtz, A.K. y [3]Juarez-Arellano, E.A.

1. División de estudios de Posgrados, Maestría en Ciencias Químicas, Universidad del Papaloapan. Circuito central No. 200.
C.P. 68301, Col. Parque Industrial. Tuxtepec, Oaxaca, México.
2. Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan. Circuito central No. 200. C.P. 68301, Col. Parque Industrial. Tuxtepec, Oaxaca, México.
3. Instituto de Química Aplicada, Universidad del Papaloapan. Circuito central No. 200. C.P. 68301, Col. Parque Industrial. Tuxtepec, Oaxaca, México.

*Autor para correspondencia: lizzette_toledo@hotmail.com

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN
El deterioro del medio ambiente y la crisis energética son cuestiones a resolver a corto plazo. El uso del hidrógeno es considerado de lo más prometedor como sustituto de combustibles fósiles. La obtención de hidrógeno por procesos fermentativos, en específico fermentación oscura aparenta ser el proceso más favorable puesto que se genera de forma continua. A demás, si se utiliza materia orgánica de residuos agroindustriales es posible obtener un producto de valor agregado a partir del tratamiento de un desecho [1]. Muchos desechos de la industria agrícola contienen almidón y/o celulosa que son ricos en carbohidratos [2], aunque la compleja naturaleza de estos residuos puede afectar negativamente la disponibilidad de azúcares simples para los microorganismos. Normalmente el proceso para obtener los azúcares simples de estos desechos es por hidrólisis ácida; aunque es la etapa de mayor gasto energético dentro de la producción y genera efluentes contaminantes [3]. Una alternativa para obtener azúcares simples es el uso de métodos físicos como la molienda mecánica de alta energía que utiliza la energía mecánica para fracturar los sustratos cambiando sus propiedades fisicoquímicas. En este trabajo se utilizaron sustratos orgánicos no convencionales como la malanga (Colocasia esculenta) y el raquis de plátano macho (Musa balbisiana). Las muestras fueron sometidas a secado, triturado y posteriormente se sometieron al proceso de molienda mecánica de alta energía. La molienda se realizó a diferentes tiempos utilizando un molino planetario, con 15 bolas de 10 mm y tazones de 80 mL, ambos de acero templado. Las muestras obtenidas se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX), análisis termogravimétrico (ATG), calorimetría diferencial de barrido (CDB) y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). También se determinaron las cantidades de azúcares por el método de DNS y su solubilidad para obtener la disponibilidad de sustratos para la fermentación.

Palabras Clave: Colocasia escuelenta; Musa balbisina; Molienda mecánica; Azúcares simples.

REFERENCIAS

[1] Blanco L. S. and Rodriguez Ch. T. Biohydrogen production from wastes via dark fermentation: A critical review (1993- 2011) Ingeniare. Revista Chilena de Ingenieria, 3, 398-411. 2012

[2] Karapinar K. and Firklet R., Bio-hydrogen production from waste materials. Enzyme and Microbial Tecnology 38, pp 569-582. 2006

[3] Redwood M. D., Orozco R. L., Majewski A. J. and Macaskie L. E. An integrated biohydrogen refinery: Synergy of photofermentation, extractive fermentation and hydrothermal hydrolysis of food wastes. Bioresourse Technology. 119 pp 384-392. 2012

CONSERVACIÓN DE SUERO DULCE BOVINO DE LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO, MEDIANTE MICROFILTRACIÓN Y TECNOLOGÍA DE BARRERAS.

Ramírez-Frausto, C., Roque-Betanzos, H.E., Escalante-García, Z.Y., Prado-Ramírez, R., y [1*]García-Parra, M.D.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, CIATEJ, Tecnología Alimentaria, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jal. 45019
Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías,

2. CUCEI, Ingeniería Química, Blvd. Marcelino García Barragán, San Pedro Tlaquepaque, Jal. 44430

*Autor para correspondencia: dgarcia@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
El suero de leche es un residuo líquido, su alto valor nutricional y las grandes cantidades desechadas lo han vuelto un foco atractivo para su aprovechamiento, sin embargo es un líquido muy perecedero y es necesario un proceso que lo conserve dulce, para así aprovechar al máximo sus nutrientes. Para tal fin, el suero se sometió a un proceso de microfiltración, el cual incluye el uso secuencial de membranas de 10, 3 y 0.8 micras, con las cuales se logró una remoción del 99.7% de los microrganismos presentes en el suero. Al suero filtrado se le adicionó un conservador bacteriostático y posteriormente se almacenaron dos muestras de suero sin tratar (SC) y dos muestras de suero filtrado (SP) a 4°C y 7°C. Todas las muestras se analizaron fisicoquímicamente, al igual que microbiológicamente, cada 7 días, durante 5 semanas. Las pruebas señalaron una estabilidad en la mayoría de los parámetros analizados, conservando el sue ro dulce durante cinco semanas.

PALABRAS CLAVE Suero Dulce; Nutrientes; Conservación; Microfiltración;

INTRODUCCIÓN

El suero de leche es un líquido que se obtiene del proceso de fabricación del queso, sobresaliendo el hecho de que para la producción de 1 Kg de queso, son necesarios alrededor de 10 L de leche, de los cuales 9 L corresponde al llamado suero. El suero contiene diferentes compuestos químicos con valor nutricional, tales como lactosa, vitaminas, minerales y proteínas [1], esto ha generado un creciente interés de parte de muchas industrias [2]. Por otro lado, al ser un producto tan rico en nutrientes, es más propenso a descomponerse o acidificarse, ya que es un medio óptimo para la proliferación de microrganismos.

Por mucho tiempo, ha sido considerado un residuo y la mayoría de las industrias queseras lo desechan; o lo utilizan para la alimentación de ganado, riego de cultivos agrícolas o simplemente se vierte en cuerpos de agua. Una industria quesera media que produce diariamente 40,000 litros de suero sin depurar genera una contaminación diaria similar a una población de 1,250,000 habitantes [3]. Comúnmente este

efluente es sometido a un tratamiento biológico que permite su depuración, sin embargo dicho tratamiento resulta ineficiente, por lo tanto es importante la búsqueda de nuevas tecnologías para su tratamiento o aprovechamiento [3].

Por lo que, para realizar la presente investigación se utilizó suero dulce de una empresa productora de queso de la región Zapopan, ubicada en el estado de Jalisco, con lo se asegura tener muestra representativa del suero producido de la región, y que el estudio encaminado al aprovechamiento del suero y así evitar la contaminación. El estudio se enfocó en estandarizar un proceso de conservación del suero dulce, donde el suero mantenga un pH en un rango de 6.5 a 5.8, en el cual, se puede aprovechar la mayor parte de los componentes de este. La finalidad de este estudio es prolongar la vida útil del suero para posteriores tratamientos, para tal fin se utilizaron la microfiltración y tecnología de barreras. Al respecto se tienen algunos estudios reportados, como lo hecho por Piot, en 1987 [4], quien mediante microfiltración con una membrana inorgánica de alúmina (1.8 micras), pudo desnatar el 98% de la grasa en leche cruda, así como remover el 99.87% de los microorganismos presentes, Por su parte Ksikowski y Mistry (1990) [5], lograron retener hasta el 99% bacterias del tipo bacillus cereus en una leche destinada a la elaboración de un queso cheddar, aumentando así su vida de anaquel (16-21 días), del mismo modo y mediante microfiltración tangencial por membranas cerámicas (0.8-1.4 □m), Saboya y Mabuois (2000) [6], obtuvieron una reducción del 99.9% de los microorganismos y esporas presentes en una leche cruda. Al igual que Fernández, en el 2012 quien utilizo membranas semipermeables las cuales lograron una remoción del 99.9% de los microorganismos presentes en el suero [7]. Es por ello que el presente trabajo dará lugar a una materia prima de mayor durabilidad y ayudara en gran medida al problema de contaminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han desarrollado procesos y tecnologías alternativas para la reutilización del suero dulce bovino resultando exitosos. En este estudio, se desarrolló un proceso de microfiltración combinando tecnología de barreras con la finalidad de prolongar la vida útil del suero. Para tal fin, el suero fue recolectado en una quesería local de la región Zapopan, Jalisco, este se recibió en botellas de vidrio estériles de 1 L de capacidad, las cuales fueron inmediatamente refrigeradas a 4°C durante un lapso de tiempo de 30 minutos para su posterior procesamiento.

La microfiltración se realizó mediante un equipo de filtración de marca 5EMD Millipore 142mm Hazardous Waste Pressure Filter System, un compresor de 1.5 HP y capacidad de 24L, papel filtro de celulosa de 10 micras y 3 micras, así como membranas semipermeables de 0.8 micras marca millipore de 142mm. El método consistió en hacer pasar 1 L de suero por las membranas en forma secuencial: 10 micras, 3 micras y por ultimo una membrana de 0.8 micras aplicando una caída de presión de 0.5 a 2 bar como fuerza impulsora Figura 1.



Figura 1. Microfiltración del suero dulce.

El suero permeado (SP) del proceso de microfiltración fue adicionado con el conservador de carácter bacteriostático de marca Bioxitral. El cual se añadió en una proporción de 3g por litro de solución. Se tomaron dos muestras de 500 ml de SP y se almacenaron a 4 y 7°C, al igual se tomaron dos muestras de 500 ml de suero crudo (SC), es decir, un suero sin tratamiento, las cuales se almacenaron a las mismas temperaturas, esto con la finalidad de corroborar la efectividad del proceso, las muestras almacenadas se analizaron por triplicado cada 7 días, durante un periodo de 5 semanas. Las pruebas fisicoquímicas realizadas fueron: pH, acidez, conductividad, grados brix y color. Del mismo modo se realizaron los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT), hongos y levaduras (HyL).

Para el recuento de BAL, se utilizaron cajas Petri con Agar MRS y se sembraron por medio del método de extensión en placa. Para los recuentos de BMA, CT y HYL se utilizaron las placas 3M™ Petrifilm™, la siembra de estos microorganismos se realizó por medio de tres diluciones, partiendo de una dilución madre de 1:10 (90ml de agua peptonada y 10 ml de suero de leche), inoculando 1 ml de cada dilución en las placas correspondientes a cada grupo microbiano, todos los recuentos se hicieron por duplicado y se incubaron de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron las 4 muestras de suero refrigeradas a 4 y 7 °C, para demostrar que tan efectivo puede ser el proceso de conservación comparado con un suero sin tratamiento. Las pruebas se realizaron cada siete días, de manera aséptica y manteniendo la cadena de frio. En la Figura 2, se muestra el análisis fisicoquímico de muestras de suero crudo y suero permeado a temperaturas de 4 y 7°C en función del tiempo. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de pruebas realizado por triplicado. Se puede observar una correlación negativa entre el pH y la conductividad del suero, es decir que a menor pH, habrá mayor conductividad, lo cual tiene similitud con lo establecido en la literatura [8]. El porcentaje de ácido láctico se incrementó al doble y el triple para las muestras de SC de 4 y 7 °C respectivamente, esto es debido al ácido láctico y otros ácidos procedentes de la degradación de la lactosa por acción microbiana. La muestra de SP a 7°C se comportó de igual manera que la muestra de SC a 7°C. Para lo correspondiente a la evaluación de los grados brix, no existió una marcada diferencia en cuanto a su contenido tanto en las muestras de suero crudo, como en las muestras de suero permeado. Lo cual se podría atribuir a la adición del conservador, ya que al ser un concentrado en polvo aunque en apariencia se homogenizaba en el suero, era igualmente sedimentable en gran manera, con lo cual esto pudo haber ocasionado que el valor de los grados brix no se redujera a pesar del proceso de

microfiltración, al margen de que las temperaturas de refrigeración tampoco representaron repercusión alguna en su contenido. Respecto al color, las muestras de SC y SP a pesar de haber permanecido refrigeradas a diferentes temperaturas, fueron prácticamente uniformes, en cuanto a su tonalidad durante toda su evaluación, por lo que se podría sugerir que el comportamiento del color en el suero, no presenta al menos en primera instancia dependencia con respecto a la temperatura. Como era de esperarse en todos los parámetros analizados la muestra más estable fue la de SP refrigerada a 4°C.

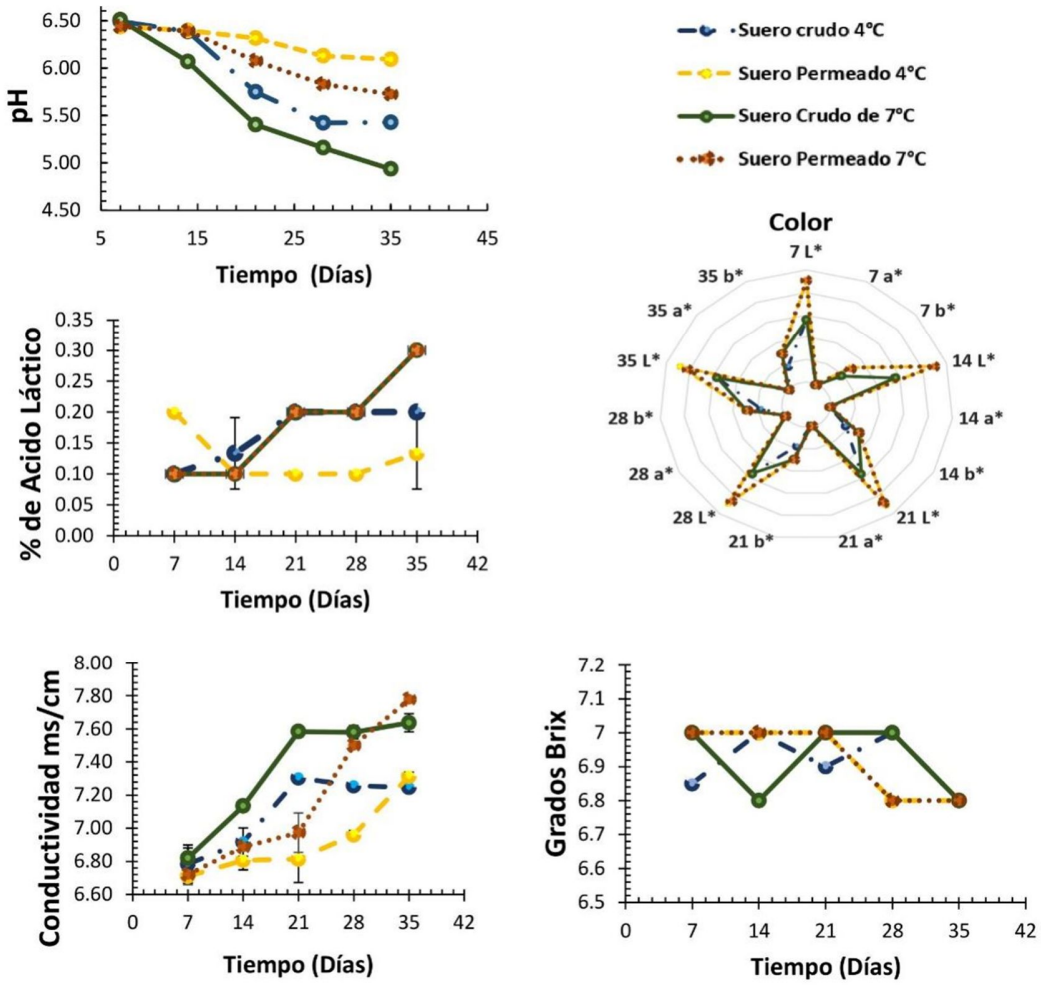
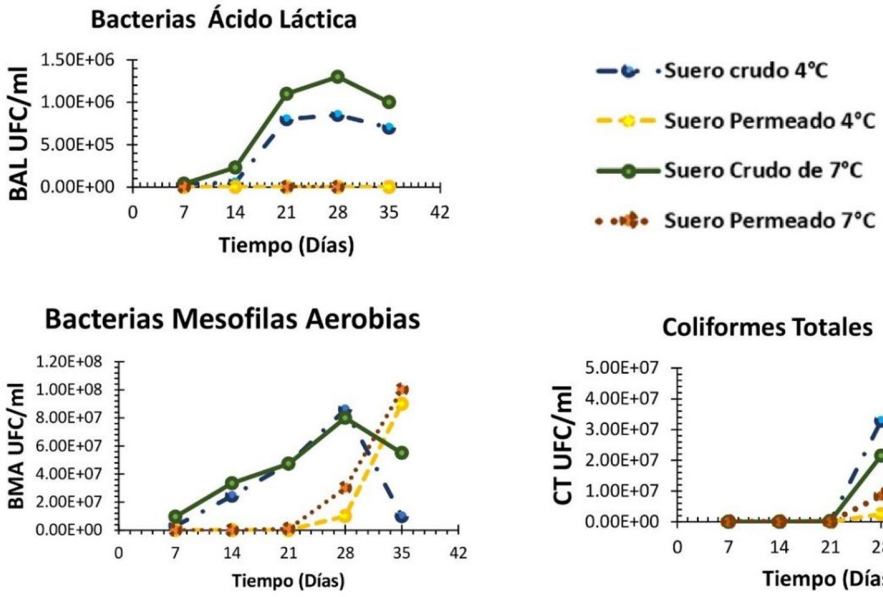


Figura 2. Análisis fisicoquímico de suero crudo y suero permeado a 4 y 7°C

Resultados microbiológicos

Al igual que las pruebas fisicoquímicas se realizaron cinco pruebas microbiológicas Figura 3. A continuación se muestra el análisis microbiológico de muestras de suero crudo y suero permeado a temperaturas de 4 y 7°C en función del tiempo. Los resultados mostrados son el promedio del análisis de pruebas realizado por duplicado.

Específicamente la microfiltración por 0.8 µm retienen la mayor parte de las bacterias presentes en el suero, pues estas oscilan en un rango de tamaño de 0.5 a 5µm [2], aunado a ello el conservador bacteriostático atenúa su crecimiento en forma adecuada, manteniendo a los sueros permeados con la misma concentración de bacterias por un mayor periodo de tiempo, en el caso de los sueros crudos, estos tuvieron un comportamiento muy similar, dejando entrever que la temperatura de 4°C estabiliza más a las muestras que la temperatura de 7°C. Evaluando el porcentaje de remoción de microorganismos, con este proceso se logró remover el 99.7% de los microorganismos presentes en el suero.



HONGO				
Tiempo (Días)	SC 4°C	SP 4°C	SC 7°C	SP 7°C
	UFC/ ml			
7	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
14	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
21	> 100	Ausencia	> 100	6 ± 2.8
28	> 10000	2 ± 1.4	> 10000	12 ±3.5
35	> 10000	3 ± 1.4	> 10000	2 ± 1.4

LEVADURAS				
Tiempo (Días)	SC 4°C	SP 4°C	SC 7°C	SP 7°C
	UFC/ml			
7	36 ± 2.8	Ausencia	60	54
14	>10	8	20	10
21	>100	33	>100	56
28	$8.75x10^5$	37	$4.5x10^5$	83
35	$5.2x10^5$	5	$9.5x10^5$	5

Figura 3. Resultados microbiológicos

CONCLUSIONES

El proceso de conservación por medio de membranas semipermeables logro la remoción de la carga microbiana en un 99.7% de los microorganismos presentes en el suero, además de ser un proceso no térmico, además el suero mantuvo sus propiedades, además de disminuir los altos costos energéticos de operación, las muestras que recibieron el tratamiento microbiológicamente se mantuvieron estables por más de 35 días a diferencia de los controles (muestras sin tratamiento) que a los 14 días ya presentaban un pH de suero ácido. Asimismo, en las pruebas realizadas se comprobó la efectividad del proceso y las

condiciones óptimas de operación, las cuales permitirán una mejor conservación, dando lugar a una materia prima de mayor durabilidad.

REFERENCIAS

[1] M. Hernández-rojasF and J. F. Vélez-Ruiz, "Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales," Temas Sel. Ing. Aliment., vol. 8, no. 2, pp. 13– 2, 2014.

[2] Bylund, Dairy Processing Handbook, vol. G3. 1995.

[3] D. Valencia et al., "La industria de la leche contaminación del agua," Elem. Cienc. y Cult., vol. 16, no. 73, pp. 27–31, 2009.

[4] G. E. Piot, M., Vachot, J. C., Veaux, M., Maubois, J. L., & Brinkman, "Ecrémage et épuration bactérienne du lait entier cru par microfiltration sur membrane en flux tangentiel.," Tech. Lait. Mark., vol. 1016, pp. 42–46, 1987.

[5] F. V. Kosikowski, V. V. Mistry, and A. Pierre, "Microfiltration, Ultrafiltration, and Centrifugation Separation and Sterilization Processes for Improving Milk and Cheese Quality," J. Dairy Sci., vol. 73, no. 6, pp. 1411–1419, Jun. 1990.

[6] L. V. Saboya and J.-L. Maubois, "Current Developments of Microfiltration Technology in the Dairy Industry," Lait, vol. 80, pp. 541–553, 2000.

[7] R. R. L, Fermández García F, "Microfiltration of Milk with Third Generation Ceramic Membranes," Chem. Eng. Commun., vol. 11, pp. 1455–1462, 2015.

[8] D. Diaz, "Comportamiento y evaluación de las proteínas dela leche (caseína y del lactosuero) frente al tratamiento térmico y ph," pp. 1–21, 2010.

EVALUACION DE LA CALIDAD DEL AGUA EN EL SISTEMA ACUATICO; LAGUNA ZUMPANGO DE OCAMPO, EN EL ESTADO DE MÉXICO.

*Reyes-Cardoso, J., Arcos-Ramos, R. y Enrique-Sainz, M.

Laboratorio de contaminación acuática. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II, Batalla 5 de mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto, Ejercito de oriente, Iztapalapa, C.D.M., C.P. 09230, México.

*Autor para correspondencia: jafetreyescardozo@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

Se evaluó la calidad del agua en la laguna Zumpango de Ocampo durante el periodo marzo 2015-noviembre 2015, con muestreos mensuales en cinco puntos de la laguna (superficie y fondo). Se evaluaron 12 parámetros físicos y químicos 10 de ellos in-situ; profundidad y transparencia (Disco de Secchi), temperatura (Termómetro), oxígeno disuelto (Oxímetro), dióxido de carbono (Método volumétrico), el pH, sólidos disueltos totales, salinidad, conductividad y potencial de óxido reducción (Multiparámetro Hanna Hi-83209) y dos parámetros más en laboratorio; demanda química de oxígeno (DQO) (reflujo cerrado) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) (dilución); todos ellos siguiendo la metodología APHA 1995 [1] . Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico: Statgraphics Centurión XVI.II; realizando un análisis Univariado de Comparación de Varias Muestras; prueba de Kruskall-Wallis y análisis multivariado; mediante Correlación de Pearson. Los resultados indicaron que todos los parámetros físicos y químicos mostraron un comportamiento heterogéneo; con valores menores (P≥ 0.05 KW) se encontraron diferencias significativas entre los meses de muestreo, de acuerdo a la profundidad la laguna Zumpango es un sistema somero (profundidad media de 1.99 m) debido a la acumulación de sedimentos, presenta una baja salinidad de 0.25 g/L y elevada alcalinidad por la presencia de carbonatos y bicarbonatos; que lo hace un sistema básico con un pH de 8.68 ubicándola fuera de la NOM-001-ECOL-1996 [2], la transparencia tiene una media de 0.20 m a causa del bloom fitoplanctónico en superficie, la concentración de oxígeno (7.31 mg L-1) en superficie y (3.02 mg L-1) en el fondo; indican un sistema predominantemente oxidativo, la DBO5 (86.52 mg O2 L-1) y DQO (160.42 mg O2 L-1) determinaron que la causa principal de contaminación es la materia orgánica debido a la entrada de aguas residuales. Las variables físicas y químicas que se encuentran fuera de los límites establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996 son: DBO5, DQO, pH y Oxígeno, de acuerdo a los Criterios Ecológicos para la Calidad del Agua (CE-CCA-001/89) son: Transparencia, pH, DBO5 y DQO [2], [3]. Por lo tanto, de acuerdo a lo establecido por: CE-CCA-001/89, NOM-001-ECOL-1996 y CONAGUA-2013 se estableció que la laguna de Zumpango es un sistema contaminado con clasificación de mesotrófico y la calidad del agua es mala con uso potencial para riego agrícola.

Palabras clave: Evaluación; Agua; Parámetros; Físicos; Químicos

REFERENCIAS

[1] APHA, AWWA, WPCF, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.U.S.A. (Métodos normalizados para el análisis del agua y aguas residual. 19ª. Edición. E.U.A).

[2] CE-CCA-001/89. Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. Acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua (D.O.F. 2 Diciembre de 1989).

[3] Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales.

ELABORACIÓN DE UNA TABLETA DE CHOCOLATE SABOR A CAFÉ PARA PERSONAS DIABÉTICAS.

[1]Díaz-Sobac, R., [2]Méndez-Hernández, M., [2]Peralta-Fuentes, M.I., [3]Díaz-Vázquez, A.E., y *[1]Vázquez-Luna, A.

1 Instituto de Ciencias Básicas.
2 Facultad de Química Farmacéutica Biológica campus Xalapa.
3 Facultad de nutrición Campus Veracruz, Universidad Veracruzana. Zona Universitaria. CP 91000. Xalapa, Ver.

*Autor para correspondencia: almvazquez@uv.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
La diabetes afecta a un 6% de la población adulta mundial, es una de las principales causas de ceguera, enfermedad cardiovascular, infarto, disfunción renal y amputaciones. La diabetes es una enfermedad cara para el individuo, las familias y los sistemas sanitarios. Es importante que los pacientes con diabetes cuenten con productos que puedan ser consumidos de manera segura y que representen una gran de satisfacer el antojo. Recientemente se han evaluado los diversos componentes del café que pueden estar implicados en la prevención de la diabetes mellitus debido al antagonismo del receptor de adenosina implicado en la capacidad de la cafeína de aumentar la lipólisis, lo que puede disminuir el peso corporal. Se elaboró una tableta de chocolate endulzándola con stevia adicionándola con café con la finalidad de ofrecer una golosina a la población diabética. Se utilizó para la formulación cacao, stevia, manteca de cacao y café adquiridos en tiendas de conveniencia, al producto elaborado se le determinaron; humedad por medio del método de termobalanza, cantidad de grasas (hidrodestilación por trampa de clevenger), proteínas por biuret, azúcares reductores por Fehling para confirmar que la stevia no aporta carbohidratos a la formulación, y cafeína por un método espectrofotométrico y el uso de un estándar, tambien se llevó a cabo una prueba sensorial para determinar si el producto era aceptado por los consumidores y de acuerdo a la formulación se calcularon las calorias de una ración de 50g. Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de humedad fueron de 4.26 ± 0.23 %, mientras que el porcentaje de grasas fue de 41.6 ± 0.91%, en cuanto a las proteínas se obtuvo un % de 12.3 ± 0.57%, este porcentaje fue menor al de un chocolate del mercado, debido a que no se le adicionó leche por ser un producto para personas adultas, que regularmente presentan problemas digestivos. Por otro lado, no se obtuvo ningún resultado para azúcares reductores y para el porcentaje de cafeína fue de 1.45 ± 0.19%. Los panelistas calificaron por arriba del 70% al chocolate en cuanto a la consistencia y el olor, con respecto al sabor y la apariencia tuvo una calificación del 80% lo que indicó que fue aceptable. En cuanto a las calorias se determinó que una ración de 50 g tiene aproximadamente 173 calorias, lo cual se considera adecuado para este tipo de productos. La elaboración de este producto resulta una opción innovadora para un sector de la población vulnerable para el cual hay que crear nuevas opciones más saludables de golosinas, además de obtener los beneficios que el café ofrece; como los ácidos clorogénicos.

Palabras clave: Diabetes; chocolate; café; stevia

INTRODUCCIÓN

Según las estimaciones realizadas por la OMS, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980. La prevalencia mundial (normalizada por edades) de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4.7% al 8.5% en la población adulta [1].

México ocupa el primer lugar en diabetes mellitus tanto en niños como en adultos, de aquí radica la importancia de proporcionar una alternativa de un producto bajo en azúcar que pueda ser consumido por esta población sin causar daños en su patología, ya que la variedad de golosinas destinadas a este sector es relativamente bajo y de los ya existentes en el mercado, la mayoría son endulzados con edulcorantes como la sacarina, aspartame, sucralosa, acesulfame k, neotamo, alitamo, en este caso la stevia no ha sido muy utilizada en la elaboración de golosinas para diabéticos y se ha vuelto necesario aprovechar tanto sus propiedades como su sabor, ya que este es más parecido al azúcar, pero sin el gusto metálico característico de los otros edulcorantes, además no es cancerígena [2].

Por otra parte, el café cuenta con diversas sustancias que pueden contribuir de manera benéfica a esta afección, como es el magnesio del café ya que este puede explicar el aumento de la sensibilidad a la insulina ya que es cofactor de muchas enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa, y su ingesta se asocia a un riesgo bajo de Diabetes Mellitus tipo dos [3]. El objetivo de este trabajo fue ofrecer a la población diabética una opción de golosina cuidando de que no afecte su salud y sea agradable a su paladar, de acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación sensorial en los parámetros de olor, color y sabor el producto se encuentra mayormente aceptado ya que los porcentajes más altos se encuentran en la categoría de me gusta y me gusta mucho, por otra parte, los porcentajes obtenidos en no me gusta mucho y no me gusta nada son mínimos, aunque si son de tomarse en cuenta para mejorar la calidad del producto.

MATERIALES Y METODOS

Humedad (Método de termobalanza)

Se colocó una porción de muestra en la termobalanza,(1g) la cual se pesó de manera inicial, se expuso a una temperatura establecida y se dejó durante un periodo de tiempo. Para determinar la cantidad de agua perdida.

Grasas (Método de Trampa de Clevenger)

Se colocó en el matraz, hasta aproximadamente un cuarto de su volumen, de la barra de chocolate, cortado en trozos pequeños. Se agregó agua destilada hasta la mitad del matraz y se colocaron cuerpos de ebullición. Se montó el matraz en su canastilla de calentamiento), sosteniéndolo con unas pinzas. Se colocó con cuidado la trampa de Clevenger engrasando ligeramente las juntas esmeriladas, y se sostuvo con otras pinzas la boca lleva el refrigerante. Se colocaron las mangueras al refrigerante engrasando ligeramente la unión, hice ayudo sosteniendo con otras pinzas. Se comenzó a calentar cuidadosamente. Asegurándose que el reflujo fuera el adecuado. El aceite se fue separando en la bureta de la trampa. Se suspendió el reflujo habiendo dejado pasar un aproximado de 1h. Se dejó enfriar un poco el aparato y se recogió el aceite en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se secó con sulfato de sodio anhidro y se vertió a un vial.

Posteriormente se realizaron los cálculos para obtener el % de grasa presente en la muestra.

Cafeína

Se pesaron aproximadamente 300 mg de café y se puso a reflujo con 200 mL de agua destilada durante 15 minutos, se filtró la solución en caliente y se añadieron 5 g de Na_2CO_3 la total disolución. Se dejó enfriar y se agregaron 15 mL de cloroformo que se extrajeron agitando suavemente durante unos minutos y se repitió esta operación una vez más. Después de la separación de las dos fases, se añadieron pequeñas cantidades de Na_2SO_4 para absorber el agua, se filtró la fase clorofórmica haciéndola pasar por papel filtro hacia un matraz erlenmeyer o balón, y se dejó evaporar hasta sequedad. Una vez eliminado el cloroformo, se añadió al mismo matraz 50 mL de Agua destilada y se agitó bien hasta perfecta disolución. Posteriormente, mediante un embudo se enraso a 100 mL en un matraz aforado. Finalmente, se tomaron 10 mL de esta última solución, se añadió 1 mL de la solución de ácido Clorhídrico 0.01 M y se enraso a 25 mL con Agua destilada. Se midió la absorbancia (270nm) obtenida de cada una de las muestras y se comparó con la curva de calibración.

Determinación de azúcares: Método volumétrico de Lane Eynon

Se midió con una pipeta volumétrica 5mL de solución B y 5ml de solución A de Fehling y se llevó a un matraz Erlenmeyer de 250mL. Se añadieron 30mL de agua destilada y unas perlas de vidrio para ebullición. Se calentó en parrilla el matraz hasta ebullición y se agregó poco a poco con una bureta, la solución patrón de lactosa, hasta la reducción del cobre. Se añadió una gota de solución acuosa de azul de metileno al 0.2% y se continuo con la titulación hasta la desaparición del color azul. Se calculó el factor de Fehling para lactosa. Se colocaron 20mL de muestra en un matraz volumétrico de 100mL con 25mL de agua. Se añadió 6mL de solución saturada de acetato de plomo, 10mL de solución acuosa saturada de sulfato de sodio y 1mL de ácido acético glacial y se mezcló. Se dejó reposar por 30 minutos. Se llevo a un volumen de 100mL con agua, se filtró y el filtrado se colocó en la bureta, se repitió el procedimiento pero titulado con la solución preparada. Se realizaron los cálculos para conocer la cantidad de azúcares en la muestra.

Proceso de elaboración de la tableta:

Se seleccionaron las semillas adecuadamente, se lavaron y secaron , se prosiguió con el proceso para tostar y reducir el porcentaje de humedad. Luego de recurrir a una desfragmentadora (mortero, licuadora,etc.) se llevó a un equipo de molienda para ser mezclado. Se pesaron 100g de manteca de cacao que se llevó a baño María hasta su total disolución, posteriormente se agregaron los componentes faltantes: 250g de cacao molido, 2.5g del edulcorante Stevia, 1g de café molido. Se dejaron integrar completamente los ingredientes y se llevó a refrigeración . Obteniendo un total de 10 barras de la mezcla.

RESULTADOSS Y DISCUSIÓN

Todos los resultados obtenidos, pueden variar según la región, dependiendo del lugar donde se compre la materia prima y los proveedores aun de la misma región; teniendo en cuenta esto, se trató de estandarizar el proceso, comprando siempre los insumos en el mismo lugar, con características de almacenamiento similares, tanto en la medida fuera posible.

En México se tiene un 0.55% en promedio de cafeína presente en el café más comercializado según Silvia Calle Aznar [6]. Con respecto a la humedad en las semillas de Cacao se tiene que para exportación establece como requisito que el contenido de humedad del grano debe ser de 6.5 a 7 %. [7] Por otra

parte, como referencia sobre el contenido de grasas en el caco se tiene como referencia que contienen un 54 %. PorPor último, a cerca de las pruebas sensoriales que se llevaron a cabo, luego de terminado el producto, empíricamente se podía saber que podría ser medianamente aceptado, ya que no se elaboró en condiciones industriales, sino de una forma casera; sin embargo, los datos que se obtuvieron de la evaluación resultaron favorables. Los panelistas calificaron por arriba del 70% al chocolate en cuanto a la consistencia y el olor, con respecto al sabor y la apariencia tuvo una calificación del 80%. De esta manera se tiene que la cantidad de materia prima que se utilizó para elaborar la tableta fue adecuada, debido a que con esa cantidad se logró la consistencia, olor, apariencia y sabor, para que los panelistas aceptaran el producto después de la prueba sensorial.

Las metodologías que se utilizaron fueron las que se encontraron al alcance de la Universidad, asimismo el resguardo de los materiales se llevó a cabo por fuera de la Institución cuidando en ambos casos mantener igualdad de condiciones en todo el proceso para que los resultados fueran significativos.
A continuación se muestra una tabla con los resultados obtenidos:

Determinación	**Materia prima(promedio)**		Producto final**(promedio)**
	Cacao	**café**	---------
Humedad	4.26%	1.23%	
Grasas	36.39%	0.38%	65.37%
% de cafeína	-------	2.69%	2.45%
Azucares reductores	-------	--------	0.013%

Comparando los resultados con los valores que se mencionan al principio del apartado se puede determinar que con respecto a la cantidad de cafeína se sobrepasa el promedio, esto puede ser resultado que durante la técnica que se realizó no sólo se midió cafeína, sino también, teobromina que tiene una estructura similar a la de la cafeína.

Sobre la humedad se tiene que está por debajo del promedio a lo que establecen los autores, sin embargo al momento de la medición presentaba características físicas agradables para ser tomado en cuenta en la producción. El porcentaje de grasas es el esperado, claro está en el producto terminado tiende a subir por la concentración de materia prima utilizada al fina. Para finalizar la cantidad de azúcar presente en el producto final es mínima lo cual nos permite comprobar que está golosina puede llegar a ser consumida por la población diabética sin causar daños a su salud.

CONCLUSIONES

Al finalizar de evaluar el producto, se puede decir que es una opción innovadora, ya que además se aprovechan los beneficios del café y la stevia, para un sector de la población vulnerable, pero que también puede ser aprovechado por personas que buscan cuidar de su salud.

REFERENCIAS

[1]Organización Mundial de la Salud. (2017). Informe mundial sobre la diabetes. [online] Available at: http://www.who.int/diabetes/global-report/es/ [Accessed 17 Feb. 2017].

[2]R. Salvador-Reyes, M. Sotelo-Herrera and L. Paucar-Menacho, "Study of Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) as a natural sweetener and its use in benefit of the health", *Scientia agropecuaria*, pp. 157-163, 2014.

[3] Rivera, O. Muñoz-Hernández, M. Rosas-Peralta, C. Aguilar-Salinas, B. Popkin and W. Willett, "Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana", *Salud Pública de México*, vol. 50, no. 2, pp. 173-195, 2008.

[4]L. Nollet, *Handbook of food analysis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2015.

[5]M. Ferhat, B. Meklati, J. Smadja and F. Chemat, "An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel", *Journal of Chromatography A*, vol. 1112, no. 1-2, pp. 121-126, 2006.

[6] S. Calle, Determinación analítica de la cafína en diferentes productos comerciales, Barcelona: Universidad Politecnica de catalunya, 2011.

[7] H. Aguilar, Manual para la evaluación de la calidad del grano de cacao, lima, 2016.

EFFECT OF HOT WATER TREATMENT COMBINED WITH CALCIUM LACTATE ON CHILLING INJURY TOLERANCE IN MANGO CV. KEITT.

*López-López, M.E., López-Valenzuela, J.A., Delgado-Vargas, F., López-Angulo, G., Carrillo-López, A., Ayón-Reyna, L. E. y Vega-García, M.O.

Doctorado en Biotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa, Cd. Universitaria, Av. de las Américas y Josefa Ortiz S/N, cp. 80010, Culiacán, Sinaloa, México

*Autorparacorrespondencia: mc.marthal@hotmail.com

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

Mango (Mangifera indica L.) fruit has a short shelf life due to its rapid climacteric ripening. Low temperature storage is commonly used to reduce fruit respiration rate and ripening; however, storage of mango at temperatures below 10-13 °C (critical temperature) can lead to chilling injury (CI) [1]. The main CI symptoms observed in mango include lenticels darkening, pitting, peel browning and discoloration, uneven ripening, and necrotic areas, as well as an increase in the susceptibility to deterioration by fungi [1]. Previous studies have shown that application of a heat treatment to mango fruit prior to their storage at low temperatures induces tolerance to CI by regulating the antioxidant system that prevents ROS accumulation [1,2,3,4].

Nevertheless, prolonged HW treatments decreased ripening rate but it can also accelerate fruit softening causing changes in the cell wall (softening). One alternative used for the retention of fruit firmness is the application of calcium salts.

So that, this study investigated the effect of the individual application of hot water (HW) quarantine treatment (46.1ºC,

75-90min) and calcium lactate salts (LacCa, 0.5% p/v) as well as their combination on the presence of chilling injury, contentof bioactive compounds, antioxidant capacity and enzymatic activity (SOD, CAT and APX) of mango cv. 'Keitt' during storage at 5 and 21°C. The individual application of a HW treatment or its combination with LacCa decreased chilling injury, which was associated with lower electrolyte leakage and MDA production in treated than control fruit during storage. The treatments induced the accumulation of bioactive compounds and enhanced the total antioxidant capacity. Likewise, the enzimatic activity of the antioxidant system change according to the treatment, showing HW and HW-Ca the higher activity in SOD, whereas HW and Ca showed higher activity for CAT and APX. These results suggest that the application of an individual HW treatment or its combination with LacCa allow to reduce CI sensitivity decreasing cell membrane damage, increasing the activity of the antioxidant enzyme system and maintaining a greater content of bioactive compounds and antioxidant capacity in mango fruits.

.

Keywords: mango; chilling injury; antioxidant enzymes; bioactive compounds; antioxidant capacity.

REFERENCIAS

[1] Z. Zhang, Z. Gao, M. Li, M. Hu, H. Gao, D. Yang, B. Yang, "Hot water treatment maintains normal ripening and cell wall metabolism in mango". Hort Sci. vol. 47, no. 10, pp. 1466–1471, 2012.

[2] M. Ghasemnezhad, K. Marsh, R. Shilton, M. Babalar, A. Woolf, "Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in “Satsuma” mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase". Postharv Biol. Technol. vol. 48, no. 3, pp. 364–371, 2008.

[3] K.K. Jacobi, E.A. MacRae, S.E. Hetherington, "Effects of hot air conditioning of “Kensington” mango fruit on the response to hot water treatment" Postharv Biol. Technol. vol. 21, pp. 39–49, 2000.

[4] K.S. Shivashankara, S. Isobe, M.I. Al-Haq, M. Takenaka, T. Shiina, "Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment", J. Agric Food Chem. vol. 52, pp. 1281–1286. 2004.

IDENTIFICATION OF PROTEINS ASSOCIATED WITH CHILLING INJURY TOLERANCE INDUCED BY HOT WATER TREATMENT IN MANGO FRUIT.

Chairez-Vega, D.A., Lopez-Valenzuela, J.A., Vega-García, M.O., López-López, M.E., Chávez-Ontiveros, J., Pineda-Hidalgo, K.V. y *Salazar-Salas, N.Y.

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.

*Autor para correspondencia: nancy.salazar@uas.edu.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

Mango is one of the most commercially important fruit in the world, but it is susceptible to chilling injury (CI), a physiological disorder that develops when the it is stored at temperatures below 13°C. Common CI symptoms in mango are lenticel discoloration, irregular ripening, pitting and decay; the inmersion of the fruit in hot water (HW) prior to cold storage reduces the incidence of these symptoms. However, the biochemical mechanisms of this effect are poorly understood. The aim of this study was to identify proteins associated with chilling injury tolerance in mango cv. Keitt with hot water pretreatment. Mature green mango fruit were divided in two groups, one of them was treated with hot water (46.1°C, 75-110 min) and the other was used as control; both groups were stored at 5°C for 20 days followed by a ripening period of 7 days at 21°C. Chilling injury index (CII) was evaluated based on the proportion of the fruit affected by each symptom and the lipid peroxidation was estimated by measuring the content of malondialdehyde (MDA) using the thiorbarbituric acid method. Proteins from mango peel were extracted with phenol and separated by two-dimensional gel electrophoreis (2D-PAGE). Gel images were analyzed with the PDQuest software and the proteins differentially accumulated between HW-treated and control fruit were identified by tandem mass spectrometry (MS/MS). HW-treated fruit showed lower CII values and MDA content than the control, indicating that the heat treatment reduced the incidence of CI symptoms and the peroxidation of membrane lipids, providing a protective effect against the cold stress. The comparative proteomic analysis between HW-treated and control fruit detected about 350 polypeptides, including 14 that were differentially accumulated; ten of the 14 proteins were present only in HW-treated fruit The proteins identified by MS/MS included two low molecular weight heat shock proteins (sHSP17.6) and a predicted heat stress transcription factor B-4b-like, which are involved in heat stress and defense processes; other proteins were identified as phytoene desaturase enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway, oxygen-evolving enhancer protein 2 that participates in photosynthesis, and a ripening-related pectate lyase associated with cell wall metabolism. These proteins may be involved in chilling injury tolerance by preventing the unfolding of proteins during the cold stress and maintaining a normal ripening metabolism.

Keywords: Proteomics; Chilling Injury; Hot Water Treatment.

REFERENCIAS

[1] V. Sivankalyani, et al., "Transcriptome dynamics in mango fruit peel reveals mechanisms of chilling stress" Frontiers in Plant Science, vol. 7, pp. 1-17, 2016.

[2] S. Yimyong, et al., "Hot water treatment delays ripening-associated metabolic shift in 'Okrong' mango fruit during storage" Journal of the American Society for Horticultural Science, vol.136, pp. 441-451, 2011.

[3] S. Zhu, et al., "The link between heat-induced polypeptides and chilling tolerance in mangoes Mangifera indica L.), with evidence from the same fruit partially heated" Journal of Horticultural Science & Biotechnology, vol. 78, pp. 523-527, 2003.

APPLICATION OF HOT WATER IMMERSION AND CALCIUM TO INHIBIT CHILLING INJURY IN MANGO. EFFECT ON POSTHARVEST QUALITY AND ACTIVITY OF CELL WALL DEGRADING ENZYMES.

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J.A. y [1,2]Vega-García, M.O.

1. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.
2. Doctorado Regional en Biotecnología. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.

*Autor para correspondencia: denisseedec@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

Mango (*Mangifera indica* L.) is a climacteric fruit which ripens quickly after harvest. Low temperature is the most effective way of maintaining postharvest quality and extending shelf life of mango [1]. However, temperatures below 10-13 °C could induce chilling injury (CI). Previous studies have shown that the application of various technologies previous storage allows to decrease sensitivity to CI in fruits. In this regard, hot water (HW) treatment has proved to be beneficial because it generates a moderate stress in the fruit that causes the activation of a response mechanism that allows it to tolerate a greater stress [2]. However, this treatment has the disadvantage of activating enzymes from the cell wall, which generates a rapid softening. On the contrary, it has been observed that calcium salts act as firming agents in various fruits, helping to maintain the integrity of the cell wall, especially when subjected to heat [3]. Thereby, the aim of this study was to analyze the effect of the application of a quarantine hot water treatment and calcium salt on the postharvest quality and the activity of cell wall degrading enzymes in mango stored at chilling injury temperature. Fruits were obtained in orchards located in the state of Sinaloa, and were divided into four lots: Control, HW, calcium lactate and HW-calcium lactate, and then stored at 5°C for 30 days. Every ten days, fruit of each treatment were randomly removed and stored at 21°C for 7 days. Chilling injury index, electrolyte leakage, content of malondialdehyde (MDA), luminosity, browning index, firmness, soluble solids content (SSC), and the activity of pectinmethylesterase (PME) and polygalacturonase (PG) enzymes were evaluated. HW and HW-calcium lactate treatments effectively reduced the sensitivity to CI of mango fruits, in addition to stimulating a lower electrolyte leakage and MDA content especially with the combination treatment. Similarly, calcium lactate and HW-calcium lactate were effective in maintaining the luminosity, lower pulp browning index, firmness and SSC content in the fruit during storage at 5°C. It was also shown that HW and HW-calcium lactate reduced PG and PME activities. In general, HW by itself or in combination with calcium lactate.

Keywords: Key words: mango; hot water; calcium salts; chilling injury.

REFERENCIAS

[1] G. Khaliq , M. T. M. Mohamed, A. Ali, P. Ding and H. M. Ghazali, "Effect of gum arabic coating combined with calcium chloride on physico-chemical and qualitative properties of mango (Mangifera indica L.) fruit during low temperatura storage," Sci. Hort., vol. 190, pp. 187-194, 2015.

[2] D. Petit-Jiménez, E. Bringas-Taddei, A. González-León, J. M. García-Robles and R. Báez-Sañudo, "Efecto del tratamiento hidrotérmico sobre la ultraestructura de la cutícula del fruto de mango," Rev. UDO. Agríc., vol. 9, no. 1, pp. 96-120, 2009.

[3] P. Ngamchuachit, H. K. Sivertsen, E. J. Mitcham and D. M. Barrett. "Effectiveness of calcium chloride and calcium lactate on maintenance of textural and sensory qualities of fresh-cut mangos," J. Food Sci., vol. 79, no. 5, pp. 786-794, 2014.

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS ASSOCIATED WITH CHILLING INJURY TOLERANCE IN TOMATO FRUIT WITH HOT WATER PRETREATMENT.

Landeros-Sánchez, A., Salazar-Salas, N.Y., López-Angulo, G., Pineda-Hidalgo, K.V., Chávez-Ontiveros, J., Delgado-Vargas, F. y *Lopez-Valenzuela, J.A.

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sin., México.

*Autor para correspondencia: jalopezvla@uas.edu.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

Tomato (Solanum lycopersicum L.) is one of the most widely consumed horticultural crops worldwide, but the commercialization of this climacteric product is limited by its susceptibility to develop chilling injury (CI) when is stored at temperatures below 12 °C. Post-harvest technologies such as the application of hot water (HW) treatments (38-54°C, 1–15 min) prior to cold storage have been shown to decrease CI symptoms in tomato fruit. However, little is known about the metabolites associated with this tolerance and the only information available in tomato is for the model cultivar Micro-Tom. In this sense, the objective of the present study was to identify phenolic compounds associated with chilling injury tolerance induced by a hot water treatment in tomato fruit cv. Imperial. Mature green tomato fruit were divided in two lots, one received a HW treatment (42°C/5 min) and the other was used as control; both lots were stored under chilling conditions (5°C/20 days), followed by a ripening period (21 °C/7 days). Fruit pericarp tissue was lyophilized and used to prepare methanol extracts, which were analyzed using a high performance liquid chromatograph equipped with an array diode detector and coupled to a mass spectrometer. This analysis identified 20 phenolic compounds, some of which showed different levels between HW treated and control fruit. The immediate tomato response to HW treatment was a decrease in chlorogenic acid, dicaffeoylquinic acid II, feruloyl hexose I, and rutin; as well as an increase in 5-caffeoylquinic acid and caffeoyl hexose I. After 20 days at 5°C plus 7 days at 21°C, HW treated fruit showed less incidence of CI symptoms than the control, which was associated with a higher accumulation of the compounds caffeoyl hexose I, chlorogenic acid, dicaffeoylquinic acid II, rutin and rutin hexoside. Chlorogenic acid and rutin are the main phenolics found in methanol extracts from tomato fruit; these compounds have multiple hydroxyl groups and therefore they are capable of inactivating reactive oxygen species. In this sense, their higher accumulation in HW-treated fruit with induced tolerance against chilling injury suggest they play an important role in the prevention of the oxidative stress associated with this physiological disorder.

Keywords: Tomato; Phenolic; Chilling injury.

REFERENCIAS

[1] K. Luengwilai, et al., "Chilling-injury of harvested tomato (Solanum lycopersicum L.) cv. Micro-Tom fruit is reduced by temperature pre-treatments," Postharvest Biology and Technology, vol. 63, pp. 123-128, 2012.

[2] L. Sevillano et al., "Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact" Journal of the Science of Food and Agriculture vol. 89, pp. 555-573, 2015.

[3] S. Gómez-Romero, et al., "Analytical determination of antioxidants in tomato: typical components of the Mediterranean diet," Journal of Separation Science, vol. 30, pp. 452-461, 2007.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DETERIORADORAS DE LACTO SUERO DULCE LÍQUIDO BOVINO, DEL ESTADO DE JALISCO, POR MEDIO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.

Ruiz-Ruiz, D., Kirchmayr, M.R., Rincón-Enríquez, G., Quiñones-Aguilar, E.E., Prado-Ramírez, R., *García-Parra, M.D.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ). Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019 Zapopan, Jal.

*Autor para correspondencia: dgarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El lacto suero es un subproducto de alto valor nutricional al seguir conservando el 55% de los nutrientes presentes en la leche como lo son lactosa, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. Debido a su composición nutricional y a la temperatura de almacenamiento se favorece el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL), que ocasionan el deterioro del lacto suero dulce ocasionado por la reducción del pH, dejando de ser utilizable para la industria; el lacto suero dulce es el ideal para su proceso por su alto contenido en lactosa y por tener una composición química más estable. En éste trabajo se realizó el aislamiento e identificación de las BAL deterioradoras del lacto suero dulce líquido bovino, de una quesería del estado de Jalisco. Para este estudio se aislaron BAL de suero dulce (pH 5.8) y suero ácido (pH 4.7), utilizando placas con agar MRS por medio de estría cruzada, se les practicaron pruebas bioquímicas (tinción Gram, catalasa y tinción de esporas). La identificación bacteriana se realizó por medio de MALDI-TOF MS y se comprobó que las BAL identificadas son deterioradoras al inocularlas en lacto suero y leche estériles, y observar la reducción del pH y la producción de ácido láctico. Los resultados mostraron que las especies presentes en el lacto suero dulce y ácido fueron *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus planatarum, Lactococcus lactis, Lactococcus garvieae, Leuconostoc pseudomesenteroides, Leuconostoc mesenteroides, Weisella confusa y Enterococcus faecalis*, además de que todas son deterioradoras del lacto suero dulce líquido bovino al reducir el pH de 5.8 hasta 4.05 y producir en promedio ácido láctico 5.2g/L.

Palabras clave: Bacterias Lácticas; aislamiento; MALDI-TOF; Suero Lácteo bovino

INTRODUCCIÓN

El lacto suero o suero de leche se define como un producto lácteo líquido translúcido color verdoso amarillento obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína durante la producción de quesos. Dependiendo de la forma como se lleve a cabo la coagulación, se tienen dos tipos de lacto suero: lacto suero dulce, éste se genera cuando se efectúa la coagulación enzimática y abarca un rango de pH de 6.6-5.8, y el lacto suero ácido que se produce por coagulación ácida, cuando se adiciona un ácido mineral u orgánico o por la acción de los microorganismos propios de la leche[1], [2].

Es un producto de alto valor nutricional al seguir conservando el 55% de los nutrientes presentes en la leche, como lo son lactosa, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, y compuestos de importancia

biológica-funcional. Sin embargo, a pesar del valor nutricional potencial del lacto suero y al aumento en su aprovechamiento para la producción de otros alimentos, aún gran parte es descartado, causando problemas de contaminación en ríos y suelos. La eliminación del lacto suero se debe entre otros aspectos, al desconocimiento de algunos productores sobre las bondades nutricionales de este subproducto y a la dificultad para acceder a las tecnologías apropiadas para su manejo y procesamiento; también, a limitaciones en la regulación alimentaria que permitan la apropiada utilización como ingrediente alimenticio. [2], [3]

Además de que la composición nutricional y la temperatura de almacenamiento favorecen el crecimiento de las bacterias deterioradoras, ocasionando que se produzca la reducción del pH como consecuencia del metabolismo de las bacterias ácido lácticas y por lo tanto deja de ser un suero dulce pH>5.8. En la industria el suero que se utiliza con mayor frecuencia es el suero dulce por su alto contenido en lactosa y por tener una composición química más estable, y al ser lacto suero ácido deja de ser útil. [2], [4]

Es bien sabido que las bacterias ácido lácticas confieren gran cantidad de características deseables a los alimentos, además de efectos antimicrobianos, pero también presentan aspectos negativos como lo es su acción deterioradora en los alimentos, ocasionando la descomposición de éstos por la generación de sus metabolitos. Por lo tanto es importante identificar cuáles son las especies de bacterias lácticas que ocasionan éste deterioro, para de esta manera buscar una forma de biocontrol que ayude a prolongar la vida de anaquel del lacto suero dulce. Una forma de identificación bacteriana rápida, fiable y que su uso va en aumento es la utilización de espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI por las siglas en inglés Matrix-assisted laser desorption/ionization [desorción/ionización por láser asistida por matriz], TOF Time-Of-Flight [Tiempo de vuelo]), la cual se basa en la obtención del perfil de proteínas principalmente ribosomales obtenido mediante la espectrometría de masas. [5], [6]

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias lácticas deterioradoras de lacto suero dulce líquido bovino, del estado de Jalisco, por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF.

MATERIALES Y MÉTODOS

El lacto suero fue recolectado de una microempresa ubicada en la ciudad de Guadalajara, trasladado a las instalaciones de Tecnología Alimentaria en CIATEJ Zapopan y almacenado a 4°C para su posterior utilización.

Aislamiento e identificación bioquímica primaria

Se sembraron alícuotas de 1 mL de suero dulce (pH 5.8) y suero ácido (pH 4.7) por extensión en superficie en el medio de cultivo específico para bacterias lácticas, Man Rogosa Sharpe (MRS), las cajas Petri inoculadas se incubaron a 32°C durante 48 horas. De las cajas Petri sembradas por extensión en superficie se tomaron colonias que denotaron características morfológicas distintas y se sembraron por estría cruzada en medio MRS incubándose a 32°C/ 48 h, se efectuaron resiembras sucesivas hasta observar aislados similares. Los aislados obtenidos se sembraron para producir biomasa y se les practicaron las pruebas bioquímicas de tinción Gram, catalasa y tinción de esporas.

Identificación de bacterias lácticas utilizando MALDI-TOF MS

La identificación de las bacterias lácticas se realizó por Espectrometría de Masas, utilizando el equipo Microflex LT MALDI-TOF (Bruker-Daltonics). Para la identificación se tomó una porción del inóculo puro y se depositó por duplicado sobre la placa de análisis MSP 96 target polished steel BC y se cubrió con 1µL de solución matriz HCCA. Los espectros se obtuvieron con 240 disparos del láser en seis regiones distintas del pocillo, los espectros generados se analizaron utilizando el software MALDI-BIOTYPER RTC aplicando el método MBT_FC, que se basa en permitir la identificación de los microorganismos considerando el tiempo requerido por las proteínas ribosales para llegar al detector lo que depende de la relación masa/carga de éstas. Cada espectro al ser comparado con la librería BDAL permitió la asignación de un puntaje, el criterio para una identificación exitosa mediante esta técnica se estableció en un score mayor a 1.7.

Comprobación de la capacidad reductora de pH y producción de ácido láctico de las bacterias ácido lácticas identificadas

La capacidad deterioradora de las bacterias lácticas identificadas se evaluó mediante la medición del pH y acidez en leche y lacto suero inoculados con una porción representativa de las bacterias ácido lácticas identificadas. Para esto se sembró en leche y lacto suero estériles (118°C/12 min) 1 mL de un cultivo lavado de 24 h de la bacteria láctica identificada y se incubó a 32°C/24 h. Transcurridas las 24 h se realizó la medición de pH (potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A111 pH Benchtop Meter Kit) y la producción de ácido láctico por medio de titulación con NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador, realizándose por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 132 aislados de los cuales solamente 85 presentaron características bioquímicas de bacterias lácticas al ser Gram positivos, catalasa negativa y no presentar esporas, además de exhibir características morfológicas propias de éste género colonias pequeñas, blancas, lechosas y redondas. De las 85 bacterias lácticas aisladas se identificaron 56 provenientes de lacto suero dulce (pH 5.8) y ácido (pH 4.7), de los cuales 42 provinieron de suero dulce, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc y Weisella*. En la figura 1 se observa que se identificaron 22 cepas pertenecientes a *Lactobacillus fermentum*, 7 cepas de *Lactobacillus plantarum*, 8 cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, 2 cepas de *Lactococcus garvieae*, 1 cepa de *Lactococcus lactis* y 2 cepas de *Weisella confusa*. En el suero ácido se identificaron 14 bacterias pertenecientes a los géneros *Lactococcus, Leuconostoc y Enterococcus*. Las especies identificadas fueron 6 cepas de *Lactococcus lactis*, 3 cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, 4 cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, y 1 cepa de *Enterococcus faecalis*.

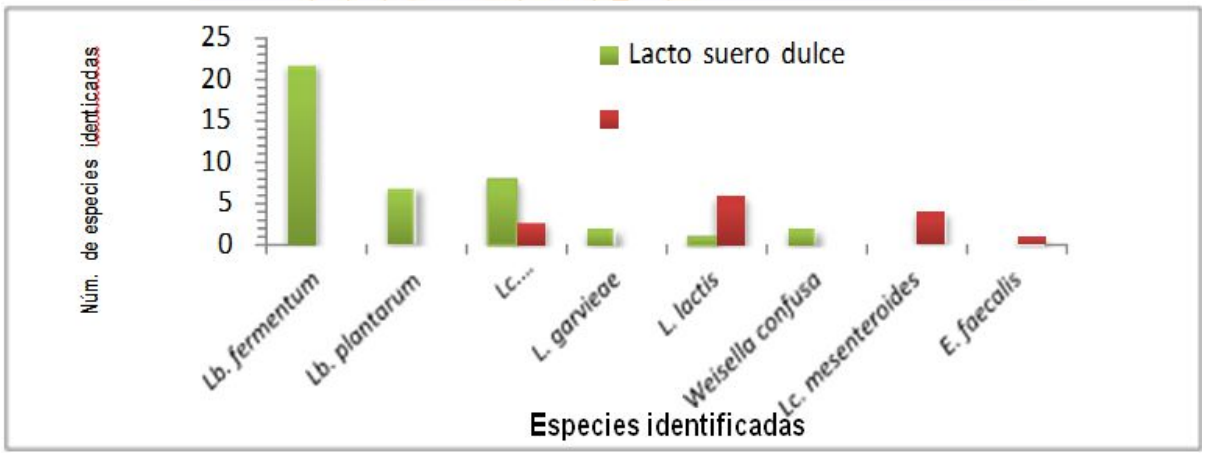


Figura 1. Gráfica de BAL identificadas

Los resultados obtenidos se asemejan a lo reportado por Marino et al., 2003, Ramírez & Vélez, 2016, y Silva et al., 2015, quienes reportaron la presencia en queso, lacto suero y leche, de los géneros *Lactobacillus, Lactococcus y Leuconostoc*, y de las especies *Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum y Lactobacillus fermentum*. En lo que respecta a las especies de *Lactococcus garvieae y Leuconostoc pseudomesenteroides* en la investigación realizada por Ramírez & Vélez, 2016, ellos reportan las presencia de los géneros *Lactobacillus y Leuconostoc*, también en ese estudio el género predominante fue *Lactobacillus* como lo es también en éstos resultados. En lo que respecta a *Enterococcus faecalis*, en el trabajo realizado por Marino et al., 2003, se reportó la presencia en leche y queso. En relación a la especie *Weisella confusa*, en la revisión bibliográfica realizada no se encontró su presencia, esto puede deberse a las regiones donde se han realizado los estudios, ya que la microbiota está influenciada por la leche utilizada, el tipo de queso y la forma de realizarlo.

Con el objetivo de saber si las bacterias lácticas identificadas son las responsables del deterioro del lacto suero dulce, se midió el pH y la producción de ácido láctico (g/L) en un cultivo de 24 h, crecidas tanto en lacto suero como en leche, obteniéndose los resultados presentados en la tabla 1 y 2.

En la tabla 1 se observa que todas las bacterias inoculadas son deterioradoras del lacto suero dulce al reducir el pH de un valor de 5.93 para el lacto suero dulce estéril hasta 4.05. En lo referente a la producción de ácido láctico se incrementó de un valor de 1.56 hasta 6.18 g/L. La cepa que mostró mayor capacidad deterioradora fue I1-2 que corresponde a la especie de *Lactobacillus plantarum* (Coincidiendo la reducción pH y el incremento de acidez), mientras que la que mostró menor producción de ácido láctico fue 1222 que corresponde a *Lactococcus garvieae* y para el pH la cepa 2721 que corresponde a la especie de *Lactobacillus fermentum*.

Tabla 1. Resultados de pH y acidez de las BAL inoculadas en lacto suero estéril.

Bacteria	No. de Cepa	pH	V_{NaOH}	Acidez (g/L)
Control	Lacto suero	5.93±0.02	0.87±0.05	1.56±0.08
Lb. fermentum	1312	4.55±0.09	2.47±0.12	4.44±0.22
Lb. fermentum	171121	4.34±0.10	2.90±0.08	5.22±0.15
Lb. fermentum	2721	4.90±0.03	2.40±0.08	4.32±0.15
Lb. fermentum	1721	4.78±0.02	2.67±0.05	4.80±0.08
Lb. plantarum	S121-3	4.26±0.02	3.20±0.22	5.76±0.39
Lb. plantarum	S11-3	4.19±0.02	3.10±0.08	5.58±0.15
Lb. plantarum	I1-2	4.05±0.01	3.43±0.17	6.18±0.31
L. lactis	A2311	4.20±0.01	3.13±0.09	5.64±0.17
L. lactis	A232	4.34±0.00	2.97±0.09	5.34±0.17
L. lactis	321	4.57±0.03	2.43±0.12	4.38±0.22
L. garvieae	1222	4.74±0.12	2.37±0.12	4.26±0.22
Lc. pseudomesenteroides	2321	4.30±0.05	2.93±0.12	5.28±0.22
Lc. pseudomesenteroides	A12	4.34±0.02	3.17±0.09	5.7±0.17
Lc. pseudomesenteroides	242	4.80±0.02	2.63±0.12	4.74±0.22
Lc. pseudomesenteroides	A32	4.21±0.03	3.23±0.12	5.82±0.22
Lc. mesenteroides	A432	4.29±0.03	2.77±0.12	4.98±0.22
Lc. mesenteroides	A21111	4.24±0.00	3.00±0.08	5.4±0.15
W. confusa	I1-1	4.24±0.02	3.20±0.22	5.76±0.39
E. faecalis	A2122	4.27±0.04	3.03±0.17	5.46±0.31

En los resultados presentados en la tabla 2, se observa que también todas las bacterias ácido lácticas son deterioradoras al reducir el pH de un valor de 6.45 para la leche estéril hasta un valor de 4.09, con respecto a la producción de ácido láctico se incrementó el valor de 2.46 hasta 10.32 g/L. La cepa que mostró mayor capacidad deterioradora fue I1-2 que corresponde a la especie de *Lactobacillus plantarum*, mientras que la que mostró menor capacidad deterioradora fue 2721 que corresponde a la especie de *Lactobacillus fermentum* Olivera, 2011, indica que el género *Lactobacillus* tiene baja capacidad acidificante, reportando a la especie *Lactococcus lactis* como la que tiene mayor capacidad, pero en un estudio realizado por Alvarado et al, 2007 una cepa perteneciente al género *Lactobacillus* mostró alta capacidad acidificante, lo cual coincide con lo obtenido en este estudio.

Tabla 2. Resultados de pH y acidez de las BAL seleccionadas inoculadas en leche estéril

Bacteria	No. Cepa	pH	V_{NaOH}	Acidez (g/L)
Control	Leche	6.45±0.06	1.37±0.38	2.46±0.68
Lb. fermentum	1312	4.86±0.02	3.93±0.12	7.08±0.22
Lb. fermentum	171121	4.44±0.05	4.83±0.12	8.70±0.22
Lb. fermentum	2721	5.56±0.13	2.90±0.29	5.22±0.53
Lb. fermentum	1721	5.52±0.07	3.07±0.25	5.52±0.45
Lb. plantarum	S121-3	4.54±0.10	4.40±0.08	7.92±0.15
Lb. plantarum	S11-3	4.70±0.08	4.03±0.17	7.26±0.31
Lb. plantarum	I1-2	4.09±0.01	5.73±0.05	10.32±0.08
L. lactis	A2311	4.61±0.02	3.87±0.12	6.96±0.22
L. lactis	A232	4.66±0.04	3.73±0.25	6.72±0.45
L. lactis	321	5.02±0.05	3.77±0.17	6.78±0.31
L. garvieae	1222	4.34±0.02	5.07±0.05	9.12±0.08
Lc. pseudomesenteroides	2321	4.24±0.07	5.27±0.53	9.48±0.96
Lc. pseudomesenteroides	A12	4.66±0.04	3.77±0.25	6.78±0.45
Lc. pseudomesenteroides	242	5.27±0.05	3.33±0.17	6.00±0.31
Lc. pseudomesenteroides	A32	4.54±0.22	3.67±0.12	6.60±0.22
Lc. mesenteroides	A432	4.77±0.03	3.73±0.12	6.72±0.22
Lc. mesenteroides	A21111	4.31±0.63	3.83±0.12	6.90±0.22
W. confusa	I1-1	4.77±0.02	4.23±0.12	7.62±0.20
E. faecalis	A2122	4.66±0.04	3.80±0.08	6.84±0.15

CONCLUSIONES

Se aislaron 85 bacterias lácticas provenientes de lacto suero dulce y ácido, de las cuales se identificaron 56, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Weisella y Enterococcus*. Las especie identificadas fueron *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus planatarum, Lactococcus lactis, Lactococcus garvieae, Leuconostoc pseudomesenteroides, Leuconostoc mesenteroides, Weisella confusa y Enterococcus faecalis*. El uso de MALDI-TOF MS, resultó ser una buena técnica rápida de identificación, arrojando una eficacia del 66% para ésta prueba.

Todas las bacterias lácticas identificadas resultaron ser deterioradoras al reducir el pH para el lacto suero dulce de 5.93 hasta 4.05 e incrementar el ácido láctico de 1.56 hasta 6.18 g/L y para la leche al reducir el pH de 6.45 a 4.09 e incrementando el ácido láctico de 2.46 hasta 10.32 g/L. La cepa que mostró mayor capacidad deterioradora fue I1-2 que corresponde a la especie de *Lactobacillus plantarum*.

REFERENCIAS

[1] Á. V. M. C. L. M. Q. T. A. L. Araujo Guerra, "A provechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental Utilization of whey as a source of nutritional energy," Revista de Investigación Agraria Ambiental, pp. 55–66, 2013.

[2] R. Córdoba Márquez, "Metodología alternativa para la reutilización del suero de queso en base a derivados de la industria cañera," 2013.

[3] E. Poveda E., "Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad," Rev. Chil. Nutr., vol. 40, no. 4, pp. 397–403, 2013.

[4] B. G., "Dairy processing handbook.," Lund, Sweden, 2015.

[5] G. Bou, A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto, and S. Valdezate, "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología," Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., vol. 29, no. 8, pp. 601–608, 2011.

[6] E. E. Fernández, "Bacterias lácticas," in Microbiología e Inocuidad de los Alimentos, Universidad de Querétaro, Ed. Querétaro, 2000, pp. 29–34.

EXTRACCIÓN ACUOSA DE FIBRA SOLUBLE A PARTIR DE LA BIOMASA DE UN SUBPRODUCTO AGROINDUSTRIAL DE *Agave fourcroydes*.

[1]Avila-Lizarraga, Y.G., [1]Sánchez-Contreras, A., [2]González-Avila, M., y [1]*González-Flores, T.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad Sureste, Tablaje Catastral 31264 Km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto Parque Científico Tecnológico de Yucatán. Mérida, México. 97302
2. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica., Av. Normalistas 800 Colinas de la Normal, Guadalajara, México 44270

*Autor para correspondencia: tgonzalez@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN
La fracción de fibra soluble del *Agave fourcroydes* está compuesta por polímeros lineales o ramificados de fructosa, unidos a una glucosa en el extremo reductor, conocidos como fructanos. En Yucatán, el *Agave fourcroydes* se procesa en 38 municipios, pero del proceso de desfibración se aprovecha únicamente el 3% del peso total, generando grandes volúmenes de residuos agroindustriales. Con la finalidad de obtener compuestos bioactivos de la biomasa generada en la desfibración, se realizó una comparación entre el contenido de fibra soluble (FS) de tres tipos de residuos: sólidos finos (4.10 ± 0.14 % FS), sólidos gruesos (3.11 ± 0.35 %FS) y líquidos (4.47 ± 0.63 %FS). La extracción acuosa de los fructanos se evaluó mediante un diseño factorial 3^2, determinando el efecto de los factores temperatura (40°C y 60°C), proporción sólido: líquido (1:6 y 1:12) y tiempo de extracción (30 min y 60 min); siendo la temperatura a 60°C ($P<0.05$), el único factor estadísticamente significativo, alcanzando una media en la extracción total de 16.5 ± 0.40 %, y una media en la extracción de fructanos de 3.46 ± 0.15 %.

Palabras clave: Fructanos; extracción; *Agave fourcroydes*; residuos agroindustriales; diseño factorial.

INTRODUCCIÓN

El *Agave fourcroydes* contiene fibra soluble compuesta principalmente por fructanos, polímeros de fructosa con enlaces glucosidicos β(2-1) y β(2-6) que están unidos a una glucosa en su extremo reductor, éstos son sintetizados en las vacuolas por β fructosiltransferasas y su abundancia en el género se debe a que cumplen funciones biológicas de reserva y osmoprotección, lo cual influye en su capacidad para crecer en ambientes áridos. Los contenidos promedio de fructanos reportados en *A. fourcroydes* van de 500 a 669.3 mg /g, representando más del 60% de los azúcares totales; también se han descrito como estructuras de bajo grado de polimerización y poco ramificadas [1], [2].

En general, la solubilidad de la fibra depende de factores como la estructura de los polisacáridos que la conforman (i.e. la presencia grupos COOH o SO_2^{-4} aumenta la solubilidad), la temperatura y la fuerza iónica [3]. Debido a las características tecno funcionales de los fructanos y su función como prebióticos, las formas de extracción y los factores que intervienen en ella se han intentado optimizar, siendo la

extracción acuosa la más utilizada. Bouaziz y col. probaron factores como la proporción de sólido/líquido, temperatura, pH, tiempo, fuerza iónica y temperatura de precipitación, concluyendo que para la extracción de fibra soluble de *A. americana* (81.55 ± 2.55%) las condiciones óptimas son: 90°C, proporción de sólido/líquido de 0.1650 g/ml de agua, agitación de 400 rpm e incremento de la fuerza iónica de 1.5 g/L [4]. En otro estudio, Flores-Girón y col., reportan rendimientos de extracción de fructanos de 37.84% en condiciones óptimas de 60°C, proporción de líquido: sólido de 10:1 y tiempo de extracción de 26.7 min [5].

El henequén (*Agave fourcroydes*) es una planta de importancia económica en comunidades rurales del estado de Yucatán, la obtención de fibras para cordelería a partir de sus hojas mediante un proceso conocido como desfibración tiene un aprovechamiento neto de aproximadamente el 3% del peso de la materia prima, generando una gran cantidad de residuos agroindustriales sólidos y líquidos que son desechados a cielo abierto.

En el presente trabajo, como una alternativa para el uso de los residuos agroindustriales de *A. fourcroydes* se cuantificó la fibra soluble de los subproductos producidos durante el procesamiento de desfibración, se utilizaron métodos enzimáticos gravimétricos con la finalidad de conocer el potencial de estos subproductos en el aislamiento de ingredientes funcionales (fibra soluble) que otorguen un valor agregado al cultivo de henequén. Después de esta evaluación preliminar, se decide emplear los residuos agroindustriales de sólidos finos, para que, mediante un diseño factorial se determine el factor con mayor influencia en el rendimiento teórico de fructanos de la extracción acuosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se recolectaron residuos agroindustriales (RA) en una desfibradora ubicada en Holactún, Yucatán (20°52'32"N 89°19'45"O). El material biológico procesado en la fecha de recolección consistió en pencas de *A. fourcroydes* de 10 años de edad provenientes de los municipios de Tahmek (20°52'27"N 89°15'22"O), Hoctún (20°51'52"N 89°12'07"O), Homún (20°44'19"N 89°17'06"O), Huhí (20°43'31"N 89°09'41"O), Acanceh (20°48'46"N 89°27'13"O), Xocchel (20°50'00"N 89°11'00"O), Seyé (20°50'14"N 89°22'19"O) y Hocabá (20°48'56"N 89°14'42"O). El material recolectado se clasificó con base al estado de la materia en residuos sólidos o líquidos (RAL), a su vez, los sólidos se clasificaron con base al tamaño de partícula inicial y a la parte del proceso de desfibración del cual se obtuvieron como residuos agroindustriales finos (RASF) y residuos agroindustriales gruesos (RASG).

Los RASF y RASG se secaron durante 72 horas a 50°C (secador JERSA), posteriormente se molieron hasta obtener una harina con un tamaño máximo de partícula de 500µm. Los residuos agroindustriales líquidos se centrifugaron (THERMO HERAEUS modelo megafuge 40) a 4700 rpm y 10°C durante 20 minutos con la finalidad de separar sólidos, posteriormente, una parte del sobrenadante se liofilizó a 0.200 mbar y -50°C (freezone-105°C de LABCONCO), obteniendo la muestra denominada RALP1 y otra parte fue secada en estufa con recirculación de aire a 50°C para obtener la muestra RALP2.

Cuantificación de la Fibra soluble

Para la cuantificación de fibra dietética total (AOAC 985.29), se utilizó un kit comercial Sigma Aldrich (TDF) con muestras por cuadriplicado (diferencias menores a 20 mg) y un blanco. A las muestras se les añadió 50 ml de buffer de fosfato (pH 6.0) y se gelatinizaron adicionando una α- amilasa termoestable

(A3306), se incubaron a 95°C durante 15 minutos, se dejaron enfriar y se les ajustó el pH a 7.5 con una solución de NaOH 0.275N. Inmediatamente después se realizó una digestión enzimática con una proteasa (P3910) en solución en de buffer de fosfato (50mg/ml), añadiendo a cada muestra 0.1 ml de la solución; con agitación constante por 30 minutos, a 60°C. Posteriormente al alcanzar temperatura ambiente, se ajustó el pH a 4 con solución de HCl 0.325M. Para remover el almidón se añadió 0.1ml de amiloglucosidasa (A9913) y se dejó con agitación continua por 30 minutos a 60°C. El residuo obtenido se filtró y lavó con agua desionizada, etanol al 96% y acetona; posteriormente se secó en una estufa con recirculación de aire a 105°C durante 5 horas, un duplicado se analizó para proteínas y otro para cenizas (AOAC 991.42).

A la fracción acuosa resultante se añadieron 100 ml de agua desionizada y 400 ml de etanol al 95% precalentado a 60°C para dejar precipitar la fibra durante 60 min, se agregó etanol al 95% para filtrar y se lavó con etanol al 78%, 96% y acetona; para el cálculo de la fracción soluble se determinaron proteínas y cenizas. Para conocer el contenido de fibra dietética soluble (AOAC 993.19) de las muestras se aplicaron la siguiente ecuación:

$$\%\ FDS = 100 \times \frac{R_{muestra} - (P_{muestra} - A_{muestra})/100 \times R_{muestra}}{SW} \quad \text{(Fórmula 1)}$$

Dónde:

FDS= Fibra dietética soluble
FDT= Fibra dietética total
R= Promedio del peso del residuo (mg)
P= Promedio del peso de la proteína (mg)
A= Promedio del peso de las cenizas (mg)
SW= Promedio del peso de la muestra (mg)

De los resultados obtenidos en esta etapa se seleccionó un tipo de residuo para continuar con las extracciones y los ensayos preliminares.

Extracción acuosa de la fibra soluble

Se planteó un diseño factorial 3^2, con 2 réplicas con el objetivo de conocer que factor o interacción entre factores maximiza la cantidad de fibra soluble extraída de los residuos agroindustriales del *A. fourcroydes.* La variable de respuesta fue el rendimiento de extracción y se consideraron 3 factores de tipo cuantitativo: Temperatura (40°C y 60°C), proporción sólido:líquido (1:6 y 1:12) y tiempo de extracción (30 min y 60 min) dando lugar a 8 tratamientos.

Todos los experimentos de la extracción acuosa se realizaron utilizando una incubadora orbital (THERMO) a 150rpm, posterior a la incubación las muestras fueron centrifugadas (30min-4700rpm-4°C) y filtradas utilizando papel Whatman No. 4 (125mm∅). Los líquidos se concentraron parcialmente en un evaporador rotatorio (HEIDOLPH modelo laborota), a 60°C con rotación variable y presión menor a 200mbar, para terminar de secarlas en estufa de vacío (JEIO TECH modelo OV-12) a 50°C con -0.04 MPa. Se determinaron los azúcares totales de los extractos obtenidos a través del método de Dubois (fenol-sulfúrico), los azúcares reductores a través del método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) [6] y saponinas por el método de Lee y col. [7].

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) para la clasificación simple de diseño completamente al azar y prueba de rangos múltiples LSD, verificando los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación del tipo de residuo con mayor contenido de fibra soluble

Los resultados demostraron que los residuos agroindustriales líquidos contienen una mayor cantidad de fibra soluble que los sólidos, esto responde al hecho de que durante el proceso de desfibración del *A. fourcroydes* se adiciona agua al momento de que las hojas pasan a la zona de engranes, ahí, la fuerza mecánica rompe las estructuras celulares permitiendo la liberación de los fructanos de las vacuolas, aunado a eso un posible incremento de la temperatura podría existir en el entorno inmediato. Se sabe que el uso del agua como solvente, la agitación o aplicación de fuerza mecánica y la temperatura son factores que influyen en la extracción de los fructanos [4], dichas condiciones se favorecen en el proceso de desfibración y permiten la liberación de la fibra soluble de las hojas hacia los lixiviados.

El tipo de residuo con un mayor porcentaje de fibra soluble fue el RALP2 (secado en estufa) con el 8.6433 ± 0.29 %, RALP1 y RASF obtuvieron valores similares entre sí (4.4733 ± 0.63 % y 4.1043 ± 0.14 % respectivamente), por su parte los RASG contienen el 3.1190 ± 0.35 %.

La cuantificación de fibra soluble en hojas de *A. americana* se ha reportado con valores de 7.72 ± 0.21 % [4], mientras que en hojas de *A. tequilana* var. Azul va del 28.15% en la punta de la hoja hasta 57.62% en la base de la hoja [8] es decir, en mayores cantidades que las cuantificadas aquí para tres tipos de residuos agroindustriales de *A. fourcroydes.*

El ANOVA (P<0.05) indicó que existe diferencia entre los tipos de residuos analizados y mediante la prueba de rangos múltiples se determinó que la única muestra con diferencia estadísticamente significativa de las otras es RALP2, en la figura 1 se puede observar la diferencia entre medias.

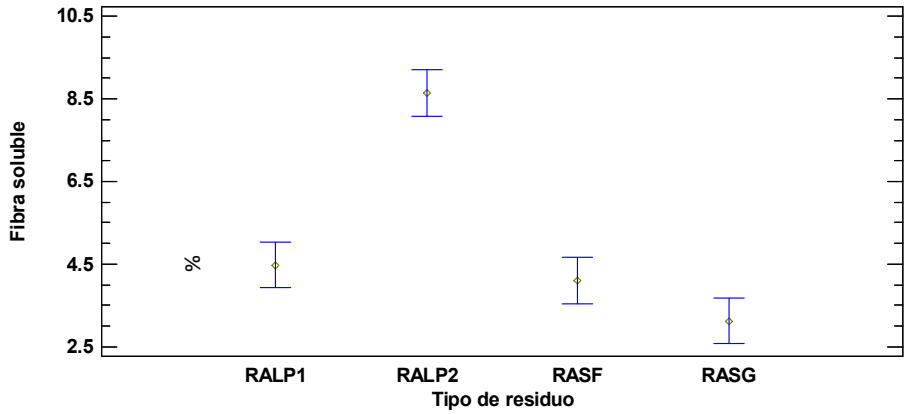


Figura 1. Medias para fibra soluble según tipo de residuo agroindustrial producido en la desfibración de *A. fourcroydes*

A pesar de que las pruebas estadísticas indican que el tipo de residuo con un mayor contenido de fibra soluble es el líquido secado en estufa, hay que hacer hincapié en el hecho de que los dos polvos (RALP1 y RALP2) fueron generados a partir de la misma materia prima, sin embargo, el tratamiento de deshidratación fue diferente entre ambos, por lo que se esperaría que tuvieran contenidos similares de fibra soluble. Se ha documentado que el calentamiento de los azúcares puede favorecer la polimerización de monosacáridos, por ejemplo, cuando la glucosa se somete a tratamientos intensos se propicia la síntesis de oligosacáridos como la gentobiosa o 6-*O*-β-D-glucopiranosil-glucopiranosa [9], mismo que por el tipo de enlace puede ser cuantificado como fibra soluble por el método 993.19 de la AOAC.

La primera diferencia visible entre los RALP1 (liofilizados) y RALP2 (secados en estufa) fue el color de ambas muestras, a partir del análisis de los valores L*, a* y b* (tabla 4) en la figura 2 se muestra de manera gráfica la diferencia entre ambos. La coloración marrón de los RALP2 da lugar a la hipótesis de que durante el secado pudo haberse llevado a cabo alguna reacción de pardeamiento no enzimático, la cual es favorecida por la cantidad de azúcares reductores y el calentamiento de la muestra, dando lugar a polímeros que confieren el color obscuro [9].



Figura 2. Colores de las harinas y polvos obtenidos de los residuos agroindustriales de *A. fourcroydes*

A pesar de los resultados del ANOVA y debido a la hipótesis de que el calentamiento modificó el tipo y contenido de azúcares de la muestra original el polvo de los RALP2 no fue considerado como candidato a realizar las extracciones, aunado a eso la obtención de los polvos es mucho menos eficiente en cantidad que la obtención de harinas debido a su contenido de humedad inicial, por lo tanto se eligió entre los otros tres tipos que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, aquel del que se obtuvo una cantidad de muestra que asegurará la conclusión de los experimentos planteados en las tres etapas de esta investigación, siendo seleccionado el RASF (Residuo agroindustrial sólido fino).

Diseño factorial de extracción acuosa

Utilizando RASF se realizaron 8 tratamientos con los factores: temperatura, tiempo de extracción y proporción de sólidos y líquidos (S:L); para los cuales se evaluaron 5 variables de respuesta. El primer resultado obtenido fue el rendimiento de extracción con rangos de 13.02 a 17.23%. Debido a que el rendimiento de extracción es un producto sin purificar se calcularon también los rendimientos teóricos en la extracción de fructanos acorde a la fórmula propuesta por Flores-Girón y col. [5], en la cual se considera el contenido de fructanos como la diferencia entre los azúcares totales y reductores (tabla 1), el volumen del solvente y el peso de la muestra, obteniendo rendimientos entre 1.08 y 3.45%, mismos que son inferiores a los reportados por el mismo autor en *A. tequilana* (17.07-36.33%), comportamiento esperado ya que como se discutió anteriormente el tratamiento mecánico y lavado al que se someten las pencas de *A. fourcroydes* durante la desfibración son responsables de pérdidas de carbohidratos solubles.

Tabla 1. Cuantificación de compuestos de interés en los tratamientos del diseño factorial de extracción acuosa

Tratamiento	Rendimiento total (%)	Rendimiento de fructanos (%)	Azúcares totales (g/L)	Azúcares reductores (g/L)	Saponinas (g/L)
40°C-1:6 -30 min	13.77 ± 0.13^{ab}	1.08 ± 1.00 ^{a}	5.34 ± 0.96 ^{ab}	4.50 ± 0.18^{a}	16.69 ± 1.43^{a}
60°C-1:6 -30 min	15.94 ± 0.03 ^{abc}	3.45 ± 0.23^{ab}	6.80 ± 0.39^{b}	4.14 ± 0.21^{ab}	14.71 ± 2.69^{ab}
40°C-1:12-30 min	14.69 ± 0.06 ^{abc}	2.32 ± 0.65^{ab}	3.21 ± 0.09^{ab}	1.98 ± 0.26^{c}	9.71 ± 0.44^{c}
60°C-1:12-30 min	16.72 ± 0.11^{bc}	3.28 ± 1.65^{ab}	4.09 ± 0.70^{ab}	2.36 ± 0.18 ^{c}	10.83 ± 1.26^{bc}
40°C-1:6 -60 min	13.02 ± 0.26 ^{a}	1.67 ± 0.65^{ab}	5.21 ± 0.59^{ab}	3.93 ± 0.09^{b}	18.20 ± 1.37 ^{a}
60°C-1:6 -60 min	16.24 ± 0.05^{bc}	3.35 ± 0.49^{ab}	6.51 ± 0.26^{b}	3.93 ± 0.13^{b}	18.12 ± 2.36 ^{a}
40°C-1:12-60 min	15.60 ± 0.10 ^{abc}	1.85 ± 0.02^{ab}	3.22 ± 0.20^{a}	2.24 ± 0.21^{c}	10.17 ± 2.41^{c}
60°C-1:12-60 min	17.23 ± 0.13^{c}	4.55 ± 2.92^{b}	4.62 ± 1.61^{ab}	2.23 ± 0.07^{c}	10.52 ± 1.81^{bc}

Letras diferentes en la misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa según procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) con un nivel del 95.0% de confianza.

El ANOVA para las variables de respuesta arrojó que el único factor que influye en el rendimiento de extracción es la temperatura (P<0.05). La prueba de rangos múltiples indicó que, a 60°C, con una media de 1.65 $\pm$ 0.04 g, este mismo factor también fue el único significativo en la extracción de fructanos (P 0.0443), con una media de 3.65 $\pm$ 0.45 %. Los resultados de los análisis de varianza que indican que la temperatura en su nivel alto contribuye a mejores rendimientos, en congruencia con los resultados reportados por Flores-Girón y col. , quienes también obtuvieron mejores rendimientos de extracción a una temperatura de 60°C en *A. tequilana* [5]. A diferencia de los resultados obtenidos, en otro estudio, la proporción de S:L de 1:6 se ha asociado a rendimientos de fibra soluble del 37.84% [4], no obstante la materia prima no es un residuo agroindustrial.

CONCLUSIONES

En este estudio se determinó que el tipo de residuo con un mayor contenido de fibra soluble fue el residuo líquido secado en estufa (8.6433 ± 0.29 %), así mismo se encontró que al realizar la extracción acuosa mediada por agitación de los residuos agroindustriales sólidos finos, una temperatura de 60°C ofrece mayores rendimientos de extracción total y valores teóricos de extracción de fructanos (3.65 ± 0.45%). Como perspectiva, es importante señalar que los residuos agroindustriales de *A. fourcroydes* contienen menores cantidades de fibra soluble que las hojas enteras de otras especies de Agave, así mismo la cuantificación del contenido de factores antinutricios conocidos como saponinas hace indispensable que los extractos sean purificados para que puedan ser considerados como fuente inocua de ingredientes bioactivos.

REFERENCIAS

[1] Y. García-curbelo, M. G. López, R. Bocourt, E. Collado, and N. Albelo, "Structural characterization of fructans from Agave fourcroydes (Lem .) with potential as prebiotic," *Cuba. J. Agric. Sci.*, vol. 49, no. 1, pp. 75–80, 2009.

[2] N. A. Mancilla, "Caracterización molecular de fructanos en Agave y Dasylirion spp., identificación de fructosiltransferasas y su expresión en Pichia pastoris," Centro De Investigación Y Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional, 2006.

[3] M. Elleuch, D. Bedigian, O. Roiseux, S. Besbes, and C. Blecker, "Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing : Characterisation , technological functionality and commercial applications : A review," *Food Chem.*, vol. 124, no. 2, pp. 411–421, 2011.

[4] A. Bouaziz, M. Masmoudi, A. Kamoun, and S. Besbes, "Optimization of insoluble and soluble fibres extraction from agave americana L. Using response surface methodology," *J. Chem.*, vol. 2014, 2014.

[5] E. Flores-Girón, J. A. Salazar-Montoya, and E. G. Ramos-Ramírez, "Application of a Box-Behnken design for optimizing the extraction process of agave fructans (Agave tequilana Weber var. Azul)," *J. Sci. Food Agric.*, no. November 2015, pp. 3860–3866, 2015.

[6] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Use," *Anal. chemestry*, vol. 31, no. lll, pp. 426–428, 1959.

[7] J. H. Lee, J. K. Jeon, S. G. Kim, S. H. Kim, T. Chun, and J. Imm, "Comparative analyses of total phenols , flavonoids , saponins and antioxidant activity in yellow soy beans and mung beans," *Food Sci. Technol.*, vol. 46, no. 2007, pp. 2513–2519, 2011.

[8] J. Montañez-soto, J. Venegas-González, and M. Vivar-vera, "Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber Azul," *Bioagro*, vol. 23, no. 3, pp. 199–206, 2011.

[9] S. Badui, *Química de los alimentos*. México: Alhambra Mexicana, 2006.

MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL ALMIDÓN DE PLÁTANO MACHO (*Musa paradisiaca* L.) CON POLIETILENO MONOALCOHOL PARA OBTENCIÓN DE UN MATERIAL FUNCIONALIZADO.

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J A. y [1,2]Vega-García, M.O. [1]Hernández-Mota, C.M.E., y. [2]Ramírez-Hernández, A.

1. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central #200, Col. Parque Industrial, San Juan Bautista Tuxtepec Oaxaca CP.68300.
2. Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan Circuito Central #200, Col. Parque Industrial San Juan Bautista Tuxtepec Oaxaca CP.68300.

*Autor para correspondencia: sttefa_mottta@hotmail.es

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

Con el objetivó de disminuir la contaminación ambiental (fundamentalmente la visual) ocasionada por los polímeros derivados del petróleo como la generada por el polietileno; del cual se sabe que es un polialcano semicristalino que presenta difícil degradación; a nivel mundial se estudia el uso de materiales naturales biodegradables, tal es el caso del almidón de plátano. Sin embargo, el almidón nativo presenta ciertos inconvenientes como bajas propiedades mecánicas, por lo cual, en este trabajo se realizó la modificación química del almidón de plátano macho (musa paradisiaca L) con polietileno monoalcohol mediante una reacción de injerto sobre la superficie de los gránulos para la obtención de un copolímero injerto almidón-g-polietileno y así de esta manera mejorar las propiedades mecánicas del almidón y a la vez generar un material con alto potencial de compatibilidad con el polietileno de posconsumo. La caracterización química por espectroscopia de infrarrojo y por análisis térmico gravitacional tanto del almidón nativo así como el almidón modificado mostro que se obtuvo el copolímero injerto almidón-g-PE. Los espectros de infrarrojo presentaron datos de solapamiento de enlace C-O en 1100 a1200 cm-1. El análisis térmico presento desplazamientos de la temperatura de descomposición debido a la modificación química del almidón.

Palabras clave: Almidón.; polietileno.; compatibilizante.; injerto.

DESARROLLO DE PRODUCTOS TIPO BOTANA CON BASE EN UNA MEZCLA DE HARINA DE MAÍZ-HARINA DE CHÍCHARO.

Campos-Medina, K.J.

Universidad Autónoma de Chihuhaua.

*Autor para correspondencia: a235963@uach.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

Las botanas de maíz se han convertido en la comida botana más importante del mundo ya que tienen una amplia base de consumo y se consideran fuente de energía y grasa. Las harinas de leguminosas son importantes para el desarrollo de nuevos productos y enriquecer nutricionalmente los alimentos. Una alternativa es la utilización de harina de chícharo por ser rica en aminoácidos como lisina, arginina y fenilalanina, y se complementan con el maíz por ser deficiente en lisina y triptófano. El objetivo de este trabajo es valorar el efecto de la adición de harina de chícharo a una harina de maíz nixtamalizada, sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de botanas horneadas y fritas. Los granos de chícharo se sometieron a remojo, secado y molienda para obtener harina y así junto con la de maíz se les realizó un análisis proximal, de granulometría y de color. Con las harinas se obtuvieron tres mezclas y un control (100% Maíz) y con ellas se elaboraron masas, se analizó la adhesividad, cohesividad, humedad, rendimiento y color. Después la masa fue laminada y cortada para obtener un producto horneado y otro frito. Las botanas se caracterizaron con un análisis proximal, índice de expansión, humedad, color, textura, rancidez y un análisis sensorial. Durante la caracterización de los productos fritos y horneados se encontraron cambios en la composición, principalmente con incrementos en el contenido de proteínas, ceniza y fibra. Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey.

Palabras Clave: Botanas, leguminosas, chícharo, proteínas, nixtamalizado.

REFERENCIAS

[1] Belitz, H. D., Groch, W., & Schieberle, P. (2009) Food Chemistry. 4th revised and extended edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Garching, Germany, pp 8-91

[2] De la Parra, C., Serna Saldivar, S. O., & Liu, R. H. (2007) Effect of processing on the phytochemical profile and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortillas chips. Journal of agricultural and food chemistry, 55 (10).

[3] FAO (1990) Utilización de alimentos tropicales: Cereales. Estudio FAO Alimentación y Nutrición.

[4] Sánchez L. (2014) Inclusión de proteína de chícharo en el desarrollo de alimentos funcionales de panificación (pan de caja). Tesis de Licenciatura. Facultad de Químicas, Universidad Autónoma del Estado de México.

DESARROLLO DE PRODUCTOS BOTANA ELABORADOS A PARTIR DE MEZCLAS DE HARINA DE MAÍZ-LENTEJA Y MAÍZ-LENTEJA GERMINADA.

*Ramírez-Ortega, A., y Rodríguez-Aguirre, P.

*Autor para correspondencia: araramz08@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua en el año 2016 y se dividió en tres etapas: Caracterización de los granos y germinación; obtención y caracterización de harinas, obtención y caracterización de masas a partir de mezclas de harina de lenteja-maíz y lenteja germinada-maíz y elaboración y caracterización del producto tipo botana en modalidad horneado y horneado-frito. Todo esto con el fin de valorar el efecto de la adición de harina de lenteja y harina de lenteja germinada, sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de botanas de maíz. Se pudo determinar el mejor tiempo de germinación y su influencia en la elaboración de los productos. Se comprobó que las harinas elaboradas con lenteja y lenteja germinada tienen un mayor valor nutrimental comparada con la harina comercial elaborada con maíz, y que al hacer mezclas de estas harinas se modifican las propiedades fisicoquímicas. Las botanas desarrolladas fueron aceptadas por los consumidores sensorialmente de la misma manera que las botanas de solo maíz, siendo las elaboradas de maíz-lenteja en versión horneada-frita las que tuvieron mayor aceptabilidad.

Palabras Clave: Germinación, propiedades, sensorial.

REFERENCIAS

[1] Álvarez Restrepo (2014). Formulación de una materia prima con competencia tecnológica para ser aplicada en el diseño de alimentos libres de gluten mejorados nutricionalmente. Tesis Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica.

[2] Atinder Ghumman, Amritpal Kaur, Narpinder Singh (2016). Impact of germination on flour, protein and starch characteristics of lentil (Lens culinari) and horsegram (Macrotyloma uniflorum L.) lines. Food Science and Technology. Vol 65: 137-144.

[3] Flores-Farias, R., Martínez-Bustos, F., Salinas-moreno, Y., and Ríos, E. (2002). Characterization of Commercial Nixtamalized Maize Flours Agrociencia. Vol 36, num. 5:557-567.

[4] Rahma E.H., El-Adaway T.A., El-Bedawey A.A. and El-Beltagy A.E. (2003). Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Menofiya University, Egypt. Pág1-13.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE RESIDUO DE HUESO DE COCO PROCEDENTE DE LA INDUSTRIA DEL CARBÓN ACTIVADO EN COLIMA.

*[1]Orozco-Gutiérrez, G., [1]García-Preciado, J.C., [1]Bermudez-Guzmán, M., [2]De Lira-Fuentes, R.C., y [3]Segura-Escamilla, G.

1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. CE. Tecomán;
2. Servicios Rurales el Tecolote SC de RL de CV;
3. Frutas Tropicales Mexicanas SPR de RL.

*Autor para correspondencia: orozco.gabriela@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La industria del carbón activado utiliza hueso de coco para su obtención. Esta materia prima es incorporada al proceso después de su resguardo en patios de almacenamiento, por lo que presenta gran cantidad de partículas que deben de ser eliminadas o separadas durante la etapa de cernido y limpieza de dicha materia prima. Produciéndose varias toneladas de un residuo constituido al cual no se le da uso dentro de la empresa Frutas Tropicales Mexicanas SPR de RL. Por tal motivo se caracterizó químicamente dicho subproducto con la finalidad de otorgarle un uso comercial, o incorporarlo al sistema de producción en campo como abono orgánico. La caracterización se realizó mediante análisis de química boximal y macro y micro nutrientes. Se determinó que dicho subproducto contiene restos de fibra de coco principalmente, así como arenas y huesillo (endocarpio) en pequeños trozos. Este subproducto cuenta con compuestos deseables para la retención de humedad al combinarse con fuentes de origen mineral al igual posee concentraciones importantes para el crecimiento de cultivos. Por ello, este subproducto puede ser utilizado como mejorador de suelos o sustrato orgánico, construyendo así una alternativa ecológica para su reincorporación al sistema de producción.

Palabras clave: Coco; fibra; sustrato; carbón activado.

INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es un fruto tropical que pertenece a la familia de las Arecaceas, presenta una forma redondeada, mide entre 20-30 cm de largo y pesa hasta 2.5 Kg. Se compone de manera general de una capa externa llamada exocarpio. Posteriormente se encuentra una capa gruesa formada por fibras duras llamada mesocarpio, que mide de 4-5cm de grosor, se compone por un tejido principal de parénquima, que al principio es translúcido y cuando madura el fruto se seca y adquiere un color café oscuro. Está compuesto por numerosas fibras que recorren el fruto en sentido longitudinal a este [12]. El de coco seco está compuesto de fibras largas, cortas y polvo del tejido medular [6], son de las fibras más duras y de longitud más corta en comparación con otras fibras vegetales. Las fibras y el tejido medular están constituidos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa [13]. El fruto de coco está formado por 35% del mesocarpio más el exocarpio [11]. La cantidad de usos que tiene la cáscara y el mesocarpio de coco es amplia, sin embargo en los principales países productores de coco es considerado como un residuo agrícola, debido a que es frecuente encontrar grandes pilas de estos

esparcidos por los campos y son foco de contaminación [2], así mismo los residuos secos son utilizados como leña para encender calderas o simplemente para eliminarlos se incineran, lo que convierte a este residuo agrícola en un potencial contaminante [7]. Este residuo agrícola se ha investigado a fondo como absorbente para la eliminación de metales pesados [10], tiene potenciales aplicaciones en la química analítica, la descontaminación del agua y tratamiento de efluentes industriales, así mismo el polvo medular se puede utilizar para la eliminación de arsénico de soluciones acuosas [3]. En México, el 85% del carbón activado de coco (Figura 1) se usa en la industria química es de importación, siendo los principales países abastecedores: Estados Unidos, los Países Bajos, Inglaterra, Alemania, Canadá y Francia.

El interés por este tipo de material se basa en algunas de sus propiedades: a) estabilidad térmica; b) resistencia al ataque ´acido; c) carácter esencialmente hidrófobo (repelente al agua); d) bajo costo relativo; e) estructura porosa. Por tal razón, en los últimos años ha aumentado considerablemente el número de investigaciones en lo que concierne a su síntesis, y a sus diversas aplicaciones, como en la separación de gases y en la industria en general.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acondicionamiento del residuo

Los residuos de fibra de coco provenían de la empresa Frutas Tropicales Mexicanas SPR de RL. Dicha empresa lo considera un desecho de su proceso productivo, ya que se genera en la etapa de limpieza y cernido de la materia prima dentro de un proceso de producción de carbón activado.

Caracterización química

La composición química comprendió la determinación del pH, materia orgánica (MO), carbono total (C), macro y micro nutrientes, conductividad eléctrica (CE) así como la capacidad de intercambio catiónico (CIC) dichos análisis fueron realizados en el laboratorio de suelo y agua del INIFAP CE Tecomán. La composición proximal se determinó de acuerdo a los métodos oficiales descritos por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) [5], comprendiendo los siguientes análisis: Humedad (M925.10), cenizas totales (Método 930.05), proteína total (Método 978.04), extracto etéreo (Método 930.09), fibra cruda (Método 7.073) y Carbohidratos totales como Extracto Libre de Nitrógeno (ELN). Caracterización de fibras - Fibra detergente neutra (FDN) Método oficial de la AOAC, [4] todos estos análisis fueron realizados en el laboratorio de bromatología del INIFAP CE Tecomán. – La Fibra detergente ácido (FDA) se digirió la muestra con ácido sulfúrico y bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), se colocó el residuo de FDN en matraz esmerilado para unidad de reflujo, se adicionó 100 mL de solución detergente ácida y se agregó antiespumante. Se colocó en reflujo y se dejó a ebullición durante 60 min. Se retiró la muestra de la unidad de reflujo, se agitó y se filtró al vacío. Se lavó con 40mL de agua caliente y acetona. Se secó a 100°C y finalmente se pesó. La lignina detergente ácido se adiciono al residuo de FDA una solución de ácido sulfúrico al 72%, se agitó durante 3 horas y posteriormente se filtró y lavó con agua caliente hasta pH neutro. Se secó a 100°C y finalmente se determinó el contenido de cenizas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Tabla 1 se presenta la composición química proximal del subproducto (en su mayoría endocarpio y mesocarpio). El contenido de humedad en el subproducto fue de 60%; con respecto al contenido de cenizas podemos decir que en su mayoría, de acuerdo a su composición en minerales, es una fuente rica en potasio y cloro, sin embargo de acuerdo a [16], con el paso del tiempo, si la fibra está expuesta al

medio ambiente, la cantidad de estos minerales se van perdiendo debido al efecto de lixiviación, provocando la eliminación de sales solubles, sin embargo el contenido de minerales depende de la variedad y lugar de cultivo del fruto.

Tabla 1. Composición química proximal del subproducto

Componente	(g/100 g de muestra seca)
Cenizas	5.3
Proteína	4.10
Extracto etéreo	3.2
Fibra cruda	38.89

El contenido de proteína y extracto etéreo en el endocarpio y mesocarpio de coco es considerablemente bajo debido a que en su totalidad está compuesto de fibras que están constituidas principalmente de compuestos lignocelulósicos. De acuerdo al contenido de carbohidratos totales podemos decir que el contenido de estos en su gran mayoría son polisacáridos estructurales como la celulosa y la hemicelulosa, que confieren propiedades de sostén y flexibilidad a las fibras. De acuerdo a [1] y [15], el endocarpio y mesocarpio del coco son considerados como una fuente rica en este tipo de compuestos lignocelulósicos, por lo que puede ser utilizado como materia prima o sustrato rico en este tipo de compuestos estructurales. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de fibras del subproducto de proceso, mostrándose un valor de fibra dietaría total de 66.01g/100g de muestra seca, de la cual podemos decir que el 37.52% de la fibra dietaría total obtenida pertenece a celulosa, siendo el este subproducto una buena fuente de este tipo de biopolímero comparado con otras fibras vegetales como el hollejo de uva [9]. Con respecto al contenido de hemicelulosa se obtuvo un 20.1% que comparado con la cascara de mango, está por debajo de esta, siendo su contenido del 28.69%, sin embargo, el contenido de hemicelulosa en fibra de coco es mayor al contenido en residuos de bagazo de agave tequilero, siendo este de 12.1%. Con respecto al contenido de lignina se obtuvo un 20.92%, que de acuerdo a Conde, (2010), el coco en estudio, corresponde a un coco joven ya que el contenido de lignina en la fibra de mesocarpio oscila entre los 12-23% para un coco joven, sin embargo, entre más va madurando el fruto, ocurre la lignificación y por lo tanto el contenido de lignina aumenta. El porcentaje restante del total de fibra dietaría es atribuido a compuestos solubles.

Tabla 2. Contenido de compuestos lignocelulósicos en subproducto de proceso.

Componente	(g / 100 g de fibra dietaria total)
Hemicelulosa	18.56
Celulosa	35.9
Lignina	19.38



Figura 1. Procedencia y fin del subproducto generado

CONCLUSIONES

El subproducto de proceso de carbón activado procedente de la empresa Frutas Tropicales Mexicanas mostró diversas propiedades fisicoquímicas y funcionales que la hacen factibles para su utilización en diversos sistemas o aplicaciones industriales como materia prima o sustrato debido a su gran contenido de compuestos lignocelulósicos, que le confieren excelente capacidad de absorción y retención de agua, al igual que una muy buena capacidad de retención de nutrientes e intercambio iónico.Por ello, puede ser utilizado como mejorador de suelos o sustrato orgánico, construyendo así una alternativa ecológica para su reincorporación al sistema de producción.

REFERENCIAS

[1] M. Abad, P. Noruega, R. Puchades, A. Maquieira and V. Noguera, "Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dust for use as a peat substitute for containerised ornamental plants". *Biores Tech,* vol: 82, pp: 241-245, 2002.

[2] K Alvarado, A. Blanco, and A. Taquechel, "FIBRA DE COCO. Una alternativa ecológica como sustrato agrícola". *Agricultura Orgánica,* vol. 8, pp: 30-53, 2008.

[3] T. Anirudhan and M. Unnithan "Arsenic removal from aqueous solutions using an anion exchanger derived from coconut coir pith and its recovery". *Chemosphere, v*ol: 66, no:1, pp: 60–66, 2007.

[4] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). "Official Methods of Analysis". Gaithersburg. MA, 1USA, 1984.

[5] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). "Official Methods of Analysis".18th edition. Gaithersburg. MA,1 USA, 2005.

[6] S. Burés, F.X. Martinez and M. Llorca, "Preliminary study of the application of Parametric linear proghamming formulation of substrate mixes" *Acta Horticulture*, vol: 22, pp: 141-152, 1988.

[7] Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA). La quema de residuos agrícolas: fuente de dioxinas. Montreal, Canadá, 2014.

[8] R.S. Conde, "Estudio de la fibra de coco con resina poliéster para la manufactura de palas de aerogeneradores de pequeña potencia". Tesis licenciatura (Ingeniero en Diseño). Universidad del Istmo, pp: 26-28, 2010.

[9] F. Figuerola, M. L. Hurtado, A. M. Estevez, "Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment". *Food Chemistry*, vol: 91: pp:395-401, 2005.

[10] S. Hasany and R. Ahmad, "The potential of cost-effective coconut husk for the removal of toxic metal ions for environmental protection". *Journal of Environ Manage,* vol: 81, no: 3, pp: 286–295, 2006.

[11] Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia (IICA). "Compendio de Agronomía Tropical", Tomo 2. San José, Costa Rica, pp: 552-567, 1989.

[12] J. León, "Botánica de los cultivos tropicales". IICA. Colección Libros y Materiales Educativos No. 84. San José, Costa Rica, pp: 43-50, 1987.

[13] M.M. Pacheco, P.M. García, and M.A. Pombal, *Atlas of Plant and Animal Histology* , 2014

[14] A., Ramírez and D. Pacheco, "Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietetica obtenidas de piña, guayaba, y guanábana". *Interciencia*, vol: 34, no:4, pp: 293-298, 2009.

[15] J. Van Dam, M. Van den Oever, E. Keijsers, J. Van der Putten, C. Anayron, F. Josol, and A. Peralta, "Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk", Part 2: Coconut husk morphology, composition and properties. *Industrial Crops and Products an International Journal*, vol: 24, pp: 96–104, 2006.

[16] L. Ir. Van Holm, "A report on Coir dust as a growing medium presented to the 7th Floricultural Symposium". Colombo. Biological nitrogen fixation project jnstitute of Fundamental Studies, Hantana, Kandy, Sri Lanka., 1993

[17] P.J Van Soest, Robertson B. and B. A Lewis. "Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nostarch polysaccharides in relation to animal nutrition". *Journal Dairy Science*, vol: 74, pp: 3583-3597, 1991.

[18] A. Yahya, H. Safie and S. Kahar, P"roperties of cocopeat-based growing media and their effects on two annual ornamentals". *Journal of Tropical and Agriculture Food Science*, vol:25, pp: 151– 157, 1997.

[19] Z. M. L. Zambrano, P. R. Meléndez and N. Y. Gallardo, "Propiedades funcionales y metodología para su evaluación en fibra dietética. En: Tecnología y Salud". Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en Alimentos. Editorial Varela. Sao Paulo, pp: 195-209, 2001.

APEGO AL CONSUMO DE UN REFRIGERIO CON SALVADO DE ARROZ Y EFECTOS EN COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS SANGUÍNEOS EN SUJETOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD.

González-Rosendo, G., García-Arellano, C.E., Quintero-Gutiérrez, A.G., Olvera-Contreras, G.L. y *Villanueva-Sánchez, J.

Departamento de Nutrición y Alimentos Funcionales-CeProBi. Instituto Politécnico Nacional. Calle CEPROBI No 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731. Tel. +52 7353942020, extensión 82525.

*Autor para correspondencia: jvillanuevas@ipn.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La obesidad produce alteraciones de glucosa y lípidos sanguíneos. El salvado de arroz es fuente de fibra y antioxidantes, viable en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Se evaluó el efecto de un mazapán con salvado de arroz, y recomendaciones de dieta saludable, sobre lípidos sanguíneos en individuos con exceso de peso. Estudio cuasi experimental de mediciones repetidas con 24 adultos (18-59 años), con sobrepeso u obesidad (IMC>25kg/m^2), que consumieron 70 g de mazapán con salvado de arroz durante 8 semanas. Los participantes recibieron orientación nutricional de acuerdo con la NOM-008-SSA3-2010 y la NOM-043-SSA2-200. Se evaluó el apego al tratamiento. Se aplicaron tres recordatorios de dieta de 24 horas. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol total en ayuno, al inicio, mitad y final del período. En cuatro semanas cada participante consumió una media de 46.5 ± 7.4 piezas de mazapán, la fibra dietaria pasó de 24±4.0 a 29±4.9 g/d, logrando una reducción significativa (19%) de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, de 118.3±53.3 a 95.6±54.2 mg/dL, $p<0.05$. Después, triglicéridos y colesterol total en plasma permanecieron sin cambios significativos hasta el final del período. Queda pendiente estudiar otras estrategias de monitoreo y formas de suplementar el salvado de arroz.

Palabras clave: Salvado de Arroz; Adherencia; Colesterol Total; Triglicéridos; Obesidad; Adultos.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es considerada como una epidemia mundial, cerca de mil millones de adultos tienen sobrepeso y más de 300 millones obesidad y 42 millones de menores de cinco años tienen sobrepeso [1]. La obesidad es un factor de riesgo para la diabetes tipo 2 y otras complicaciones derivadas de un alto índice de masa corporal, como son las enfermedades cardiacas y la hipertensión, así como por los altos costos que implica su atención [2].

Se ha descrito que los factores de riesgo para la obesidad y sus enfermedades asociadas, son prevenibles y es posible contrarrestarlos con medidas específicas como: 1) Intervenciones sobre el estilo de vida y el consumo de suplementos dietéticos, 2) farmacoterapia y 3) cirugía bariátrica. Un cambio del estilo de vida, incluyendo una dieta saludable y ejercicio físico, en conjunto con un manejo efectivo de suplementos, podría presentar una intervención costo-efectiva para la obesidad [3].

Se ha reportado que el consumo elevado de fibra de cereales o mezclas de granos enteros y salvado disminuye riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y obesidad, con [4]. El arroz (Oryza sativa) es un cultivo importante y un alimento básico para más de la mitad de la población mundial [5]. El salvado de arroz (SA) es un subproducto del procesamiento del arroz, que resulta ser muy rentable y con alto valor nutricional para su uso en alimentos de panificación, galletería, bebidas y frituras por su alto contenido en fibra y sus buenas características mecánicas [6].

El SA se constituye principalmente por almendra harinosa, capa de aleurona y germen, y representa el 8% del peso del grano. Tiene un contenido de lípidos de 18% - 23%, proteínas de 12 – 16%, hidratos de carbono de 8 - 36%, fibra total de 23 – 35%, humedad del 4 - 8 % y cenizas del 7 - 10% [7]. El SA además de ser una fuente importante de fibra soluble, contiene antioxidantes (vitamina E), y compuestos bioactivos (gamma-oryzanol y fitoesteroles) que se ha estudiado favorecen la disminución de la colesterolemia [8].

Dado que el salvado de arroz es fuente de fibra y antioxidantes, puede constituirse en un alimento viable en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Se evaluó el efecto de un mazapán con salvado de arroz, y recomendaciones de dieta saludable, sobre lípidos sanguíneos en individuos con exceso de peso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de estudio y participantes

Diseño de estudio cuasi experimental de mediciones repetidas (Fig.1). Fueron incluidos 24 adultos de 18 a 59 años con sobrepeso u obesidad (Índice de masa corporal [IMC] >25kg/m^2) de un total de 39 voluntarios captados por invitación de manera verbal y envió de invitación al correo institucional a la comunidad del CeProBi. Fueron excluidos del estudio sujetos que declinaron participar; aquellos con diagnóstico previo o signos clínicos de Diabetes Mellitus tipo 2, ECV, cáncer, embarazo y lactancia; o que estuvieran consumiendo medicamentos o suplementos.

Mazapán de salvado de arroz

Durante un período de 8 semanas consumieron 2 piezas (70 g) de mazapán con salvado de arroz. La composición del producto se describe en la tabla 1.

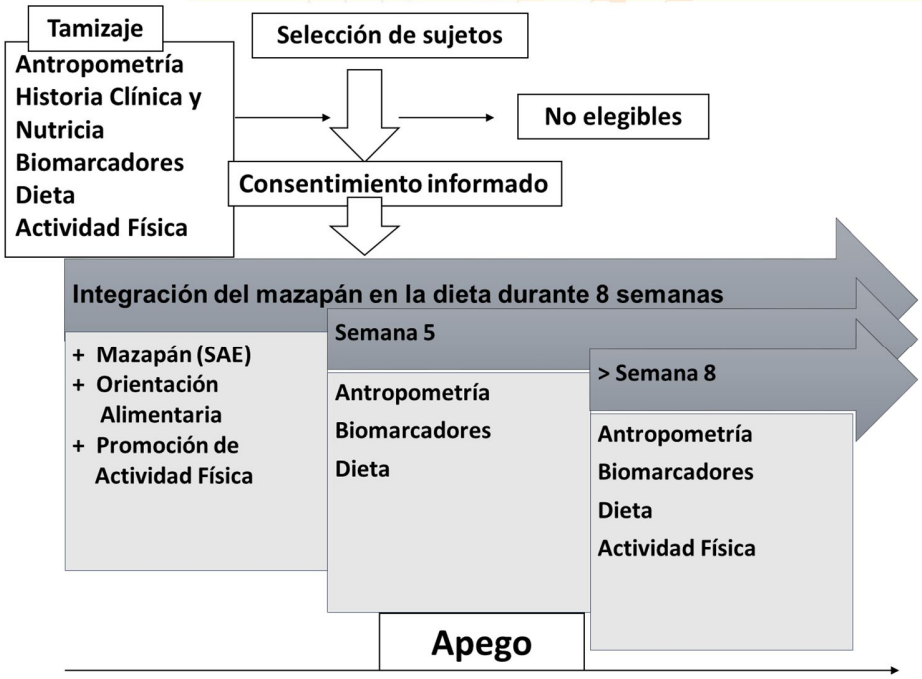


Figura 1 Diseño general del estudio. Se muestran las etapas de suplementación con el producto elaborado con SA y, procesos de control y medición del efecto.

Tabla 1. Composición del mazapán con SA.

Componentes	Contenido p/porción de 35 g
Lípidos (g)	12.3
Proteínas (g)	10.2
HC Totales (g)	6.6
Fibra Total (g)	2.0
Vitamina E (µg) Tocoferol (%) Tocotrienol (%)	48.5 73.0 27.0
γ-Orizanol (mg)	34.3
Energía (Kcal)	178

Fuente: Alvabera, 2017 [9].

Adicionalmente, los participantes recibieron orientación nutricional de acuerdo con la NOM-008-SSA3-2010 [10] y la NOM-043-SSA2-2005 [11]; así como recomendaciones generales sobre cantidad y calidad de actividad física para el mantenimiento y reducción de peso de acuerdo con lineamientos de la OMS (30 min/día, 5 veces/semana o >150 min/semana de actividad física vigorosa) [12].

Apego
Personal entrenado evaluó apego al tratamiento mediante la aplicación de un formulario de registro diario con descripción de cantidad y opiniones del consumo. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol total en ayuno, al inicio, mitad y final del período.

Antropometría
Se determinó el peso con equipo de medición de composición corporal (Tanita, TBF 300 analyzer, Japón); la talla con estadiómetro (Seca modelo 214 Alemania). Con datos de peso y talla se calculó el IMC (Peso/talla^2) y fueron clasificados de acuerdo con criterios de la OMS [13]

Bioquímica clínica
Fueron extraídas muestras de sangre venosa en ayuno y se determinaron las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol total, al inicio, mitad y final del período. El análisis se realizó con equipo y reactivos recomendados por el proveedor (Spinreact Analyzer, España).

Dieta
Personal entrenado aplicó cuestionarios de recordatorio de dieta de 24 horas, uno al inicio, en la semana 5 y al final de la semana 8. Enseguida fueron calculados el consumo de energía y nutrimentos relevantes para el estudio en el programa Nutrikal (v2).

Análisis Estadístico
Los resultados se describen con medidas de tendencia central y dispersión. Se aplica ANOVA y test de Tukey para comparación en parejas con un nivel de significancia [p] de 0.05 con uso del software SPSS Statistics v22 (IBM, E.E.U.U.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Se muestran resultados de estudio en el que participaron 24 adultos que cumplieron con los criterios de selección, aceptaron participar por escrito y completaron el estudio. En las primeras cuatro semanas cada participante consumió una media de 46.5 ± 7.4 piezas de mazapán, el consumo medio durante el segundo periodo se redujo significativamente a 34.0 ± 10.3 piezas, p>0.05. En general el apego al tratamiento, representado por el consumo de piezas de mazapán programadas por semana, se redujo del 93% hasta un 53% en la octava semana. Se ha discutido acerca de que los resultados de una intervención pueden afectarse si no se siguen los tratamientos, aunque éstos sean muy buenos; hay estudios que reportan altos índices de abandono del tratamiento (46%) durante los primeros seis meses en los programas de intervención que promueven cambios a través de intervenciones educativas [14] y del 68% en tratamientos nutricionales [15]. Los autores proponen que el apego al tratamiento para el control de peso podría estar asociado a variables psicológicas del sistema de creencias tales como el locus de control, autoeficacia percibida, creencias de salud.

Como se muestra en la tabla 2, al inicio 30% de los participantes presentaban obesidad, cifra que se redujo a 22% después de la semana 4. Al término del período solo un participante se mantuvo con esa reducción. Este resultado modesto podría explicarse por una reducción en la ingesta de energía de la dieta y aumentos en la actividad física que alguno de los participantes fue capaz de mantener hasta finalizar el estudio.

Tabla 2 Estado de nutrición de participantes a lo largo de 8 semanas de intervención, incluyendo el consumo de mazapán con SA.

Estado de nutrición	**Basales (n=24)**	**5 semanas (n=23)**	**8 semanas (n=21)**	**Sig**
	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	**(*p*= <0.05)**
IMC (kg/m²)	28.44 ± 3.15	28.42 ± 2.88	28.64 ± 3.40	0.22
Sobrepeso (%)	70	78	72	**0.79**
Obesidad (%)	30	22	28	**0.45**

Se presentan promedios y D.E. *p* valor de significancia estadística de diferencias entre períodos mediante ANOVA.

La inclusión del mazapán incrementó el consumo de fibra dietética y nutrimentos relacionados como la vitamina E. También aumentó el consumo de energía al final del período (ver tabla 3).

Como se describe en la figura 2, las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol en el conjunto, que al inicio se encontraban cerca de los limites considerados de riesgo (Triglicéridos >150 mg/dl; Colesterol Total>200 mg/dl), al final del estudio se observaron igual. Sólo las concentraciones de triglicéridos se redujeron de manera significativa al final de las primeras 4 semanas de intervención. Se ha determinado la capacidad de la fibra dietética de limitar la absorción intestinal de triglicéridos y colesterol gracias a su acción quelante sobre las sales biliares, además de servir como sustrato de la producción intestinal microbiana de ácido propiónico que provoca una disminución de la síntesis endógena de colesterol [16].

Tabla 3 Evaluación de componentes de la dieta de participantes a lo largo de la intervención, incluyendo el consumo de mazapán con SA.

Componentes de la dieta	**Semana 0 (*n* = 24)** $\bar{x} \pm \sigma$	**Semana 5 (*n* = 23)** $\bar{x} \pm \sigma$	**Semana 8 (*n* = 23)** $\bar{x} \pm \sigma$	**Sig (*p*= <0.05)**	**IDR**
Energía (kcal/día)	**1961.38 ± 101.2**	1973.04 ± 107.8	**2215.98 ± 139.34**	**0.026**	---
Lípidos (%)	32	29	29	0.098	20-30
Proteínas (%)	15	12	13	0.080	10-15
HC (%)	53	59	58	0.060	45-60
Fibra (g)	**24 ± 4.7**	**29 ± 4.9**	**28.5 ± 3.9**	**0.011**	25-30
Vitamina E (mg)	**2.04 ± 0.9**	1.33 ± 1.9	**4.28 ± 1.1**	**0.008**	11 (IDS)
Colesterol (mg)	180 ± 16.7	172 ± 8.9	189 ± 21.1	0.080	<200

Se presentan promedios y D.E. p valor de significancia estadística de diferencias entre períodos mediante ANOVA.

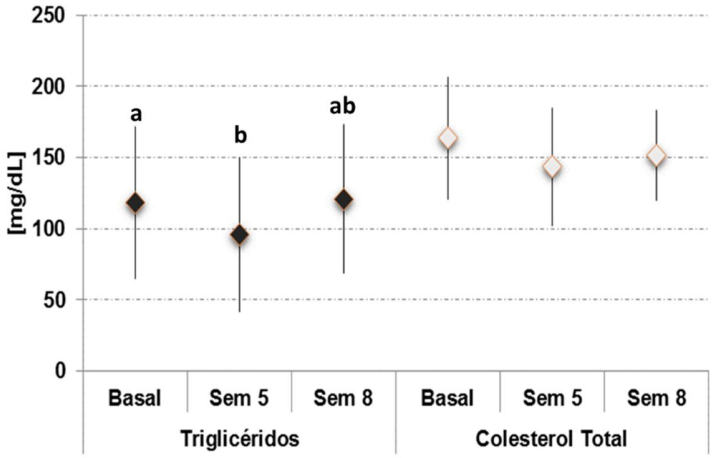


Figura 2 Concentraciones sanguíneas de triglicéridos y colesterol total a lo largo de la intervención incluyendo el consumo de mazapán con SA. Las figuras y barras verticales representan promedios ± D.E. Letras superindices diferentes (a-b) significan diferencias significativas ($p<0.05$) mediante prueba de Tukey post ANOVA de un factor.

CONCLUSIONES

El estudio obtuvo información experimental del efecto que tiene el consumo de un mazapán elaborado con salvado de arroz en personas con sobrepeso y obesidad. El consumo del mazapán no impacto significativamente el estado ponderal medido con el IMC. Las concentraciones de triglicéridos disminuyeron al comparar la semana inicial a la semana 5, reestableciéndose al final del estudio. La reducción en las concentraciones sanguíneas de colesterol no fue significativa. Se puede concluir que el mazapán con salvado de arroz es un alimento con propiedades funcionales, sin embargo, los resultados plantean la hipótesis de que el consumo de este u otros alimentos funcionales, debe ir acompañado con cambios en el estilo de vida, como una alimentación saludable y aumento en la actividad física.

REFERENCIAS

[1] C.M. Apovian, N. Gokce. Obesity and cardiovascular disease. Circulation. Mar 6;125(9):1178-82. 2012.

[2] Organización Mundial de la Salud. Estadísticas sanitarias mundiales 2014. Ginebra 27, Suiza. ISBN 978 92 4 069269 5. 2014.

[3] P.W. Chong, Z.M. Beah, B. Grube, L. Riede. IQP-GC-101 Reduces Body Weight and Body Fat Mass: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Phytotherapy Research.;28(10):1520-1526, 2014.

[4] S.S. Cho, L. Qi, G.C. Jr Fahey, D.M. Klurfeld. Consumption of cereal fiber, mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr, 98(2):594-619, 2013.

[5] A.A. Wani, P. Singh, M.A. Shah, U. Schweiggert-Weisz, K. Gul and I.A. Wani. Rice starch diversity: Effect on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties – a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 11(5): 417-436. 2012.

[6] I. Lima, H. Guaraya y E. Champagne. The functional effectiveness of reprocessed rice bran as ingredient in bakery products. Nahrung 46: 112-117, 2002.

[7] R. Cheruvanky, I. Johnson & G. Williamson. Phytochemical products: rice bran. Phyto-Chemical Functional Foods, 347-376, 2003.

[8] C. Daou, H. Zhang. Functional and physiological properties of total, soluble, and insoluble dietary fibres derived from defatted rice bran. Journal of Food Science and Technology; 51(12):3878-3885, 2014.

[9] Albavera S. Diseño y caracterización de un mazapán elaborado con salvado de arroz como alternativa de alimento funcional. Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional, 2017.

[10] Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. DOF: 1-10, 2010.

[11] Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. DOF: 32-49, 2005.

[12] Organización Mundial de la Salud. Recomendaciones mundiales sobre actividad física para la salud. Ginebra, Suiza. ISBN 978 92 4 359997 7, 2010.

[13] Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. Centro de Prensa. Nota descriptiva N°311. 2016.

[14] C. Gómez, S. Palma, M. Piedra, et al. Assessment of compliance and effectiveness of our therapeutic-educational program for patients with grade II obesity with complications and morbid obesity who do not pass the bariatric surgery protocol. *Nutr Clínica Dietética Hosp*; 29 (3): 25-31. 2009.

[15] I.L. González, A.N. Giraldo, A. Estrada, A.L. Muñoz, E. Mesa and C.M. Herrera. La adherencia al tratamiento nutricional y composición corporal: un estudio transversal en pacientes con obesidad o sobrepeso. Revista chilena de nutrición, 34(1), 46-54. 2007.

[16] E. Escudero y P. González. La fibra dietética. Nutr. Hosp. 21 (Supl. 2) 61-72, 2006.

CARACTERIZACIÓN DE POLVO DE NOPAL SECADO POR ASPERSIÓN.

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J.A. y [1,2]Vega-García, M.O. [1]Solano-Navarro, A., [1]López-González, C., [1]Domínguez-Carrillo, M.N., [2]González-Rosendo, G., [2]Villanueva-Sánchez, J. y [2]Quintero-Gutiérrez, A.G.

1. Departamento de Desarrollo Tecnológico.
2. Departamento de Nutrición y Alimentos Funcionales, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos IPN, Calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, C.P. 62731, MÉXICO.

*Autor para correspondencia: jvillanuevas@ipn.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN

El nopal es una cactácea endémica del continente americano perteneciente a los géneros Opuntia y Nopalea. La capacidad de sobrevivencia del nopal en ambientes áridos se asocia a la presencia de mucílago en los cladodios (tallos deformados) del nopal; este compuesto es capaz de absorber grandes cantidades de agua y mantener a la planta hidratada por largos períodos de tiempo. El mucílago se asocia con características funcionales, pues es benéfico en la prevención y control de diversos padecimientos (reducción de las concentraciones de glucosa y de colesterol en sangre, así como en la estabilización del vaciamiento gástrico); además, los nopales son fuente de vitamina C, minerales y fibra soluble e insoluble. Los tiempos prolongados a los que es sometido el nopal al ser deshidratado de manera convencional (secado en estufa), provocan una situación de "estrés" térmico e hídrico que disminuyen la calidad del producto deshidratado (polvo). Debido a la estructura del nopal y a su alto contenido de humedad inicial, al secarlo sufre un fuerte encogimiento o deformación, que dificulta su rehidratación y hace más difícil el aprovechamiento de sus características funcionales. Por lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo obtener un polvo de nopal fresco secado por aspersión como método de secado alternativo y realizar su caracterización como una posible base para elaborar bebidas, como una opción para aprovechar las características funcionales propias del nopal. El polvo de nopal presentó 2,39% de humedad, 16.23% de fibra dietética, el tiempo requerido para su humectación fue de 25.88 minutos; el porcentaje de solubilidad se realizó a pH 5, 6 y 7, presentando una solubilidad media; como parte de la caracterización química se evaluaron los grupos funcionales presentes en el polvo mediante espectroscopia infrarroja por ransformada de Fourier (FT-IR) y se determinó que corresponden a fibra dietética. La densidad de masa fue de 0.8 g/cm3, el color fue verde amarillo; y la capacidad de rehidratación fue de 5g/100 ml. Con los datos obtenidos se concluye que el polvo mantiene algunas características propias del nopal, por lo que sería muy útil para elaborar alimentos funcionales, entre ellos bebidas, preservando algunas características funcionales del nopal asociadas con la fibra dietaria.

Palabras clave: Nopal, fibra dietaría, secado por aspersión, polvo.

REFERENCIAS

[1] Rodríguez-González, S., Martínez-Flores, H. E., Chávez-Moreno, C. K., Macías-Rodríguez, L. I., Zavala-Mendoza, E., Garnica-Romo, M. G. and Chacón-García, L. 2014. Extraction and

characterization of mucilage from wild species of Opuntia. Journal of Food Process Engineering 37: 285-292

[2] Sáenz, C., Sepúlveda, E. y Matsuhiro, B. 2004. Opuntia spp mucilage's: a funcional component with industrial perspectives. Journal of Arid Environments, 57: 275-290.

[3] Torres-Ponce RL, Morales-Corral D, Ballinas-Casarrubias ML, Nevárez-Moorillon GV. 2015. El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimento y nutrición animal. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (Mex); 6 (5): 1129-1142.

EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE FIBRAS NATURALES EN BASES DE PAN TIPO PIZZA.

[1]Salazar-Pérez, C.O., [2]Esquivel-Salgado, L., y [1*]Morales-Hernández, N.

1. Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C, Camino Arenero 1227, El bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, C.P 45019, México.
2. Universidad Politécnica del Valle de Toluca, Ingeniería en Biotecnología, Toluca-Almoloya de Juárez, Santiaguito Tlalcilalcali, Almoloya de Juárez, Estado de México, C.P 50904.

*Autor para correspondencia: nmorales@ciatej.mx.

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
En este trabajo el objetivo fue evaluar el efecto al incorporar fibra de fuentes naturales, se evaluaron 3 tipos de fuentes de fibra natural y 3 concentraciones de incorporación y un control de harina refinada. Se elaboraron 10 bases de pizza a cada muestra se les realizó la caracterización fisicoquímica (humedad, actividad de agua y pH) así como el parámetro de textura evaluando la fuerza de extensibilidad como fuerza máxima, trabajo y fuerza a 2mm de distancia. Los resultados mostraron que la incorporación de fibra como sustituto de harina posee características fisicoquímicas similares al control, el contenido de humedad varió de 9.71% a 25.68% relacionado al contenido de fibra incorporada, el pH estuvo entre 5.5 a – 5.7 en las bases de pan. Los valores de Aw oscilaron entre 0.85 – 0.91, la apariencia de todos los productos fue muy similar, sin embargo el contenido de fibra impactó en el parámetro de elasticidad de las bases de pan tipo pizza, donde se generó un producto con una mayor fuerza de ruptura a diferencia de los controles. La fibra natural incorporada a las bases de pan tipo pizza generó características de suavidad semejantes a la harina refinada en el producto final.

Palabras clave: Fibra Natural; Pan de Pizza; Textura.

INTRODUCCIÓN

El trigo es una fuente de alimentos conveniente, nutritiva y económica. Provee alrededor de una quinta parte de todas las calorías consumidas por la humanidad; junto con otros cereales, este constituye la triada de granos básicos de la alimentación de la población humana (Comerio, (1998)). Los productos horneados en la actualidad son de gran importancia en la alimentación humana, especialmente aquellos que se formulan con la base de harina de trigo, mismos que son consumidos de forma masiva. Entre ellos, el pan ocupa un lugar preponderante en todo el mundo. Existe, sin embargo, un grupo poblacional que presenta intolerancia no sólo al trigo, sino también al consumo de otros cereales (Sánchez, 2008).

Durante las últimas dos décadas, el conocimiento de la influencia de la dieta sobre la salud y el bienestar ha incrementado, lo que ha llevado a diseñar alimentos nuevos y más saludables reduciendo así el riesgo de diversas enfermedades crónicas. Estos son conocidos como alimentos funcionales que además de actuar como nutrientes pueden influir positivamente en funciones biológicas específicas, mejorando el estado general de salud y/o disminuyendo el riesgo de padecer diferentes enfermedades (González Fuentes, 2014).

La adición de fibra natural en productos horneados puede ocasionar problemas en cuanto al manejo de la masa y aceptación de la misma debido a cambios en el comportamiento reológico, la reducción del volumen del pan, así como un aumento en la dureza de la miga y un sabor y sensación inadecuados. Estos efectos letales sobre las masas y calidad del pan dependen en gran medida de las propiedades del tipo de fibra utilizado, donde estos efectos opuestos han sido observados frecuentemente. En distintas investigaciones en donde se involucran alimentos horneados se ha demostrado que estos poseen una mayor cantidad de fibra, aportando grandes beneficios al consumidor. Con la finalidad de obtener un producto horneado que cumpla con las características necesarias para ser considerado un alimento funcional, se desea analizar las características fisicoquímicas de una base de pan tipo pizza, con la adición de diferente porcentaje de fibra natural, esto con el interés particular de observar el comportamiento de la fibra natural comercial como sustituto de harina, el cual incluye una caracterización fisicoquímica del producto obtenido, así como un análisis de textura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de la base de pizza se trabajó con una formulación en la cual se varió la cantidad adicionada de fibra natural, la cual funge como sustituto de harina de trigo. La formulación contiene 59.11% de harina refinada, 0.84% de levadura seca, 6.04% de aceite, 31.21% de agua tibia, 0.72% de azúcar, 0.96% NaCl, así como la adición de fibra natural (Fructano 1, Fructano 2 e Inulinas) en diferentes porcentajes (2.5%,5%,7.5%) para cada uno de los tratamientos, además del Control 1 (Harina Refinada).

Para la preparación de la base de pizza, se mezcló la harina y la levadura, posteriormente se le adicionó agua, esta mezcla se dejó reposar durante un tiempo de 5 minutos, se adicionó aceite, azúcar y sal a la mezcla. La incorporación se realizó mediante una batidora a una velocidad de 135-180 rpm, posteriormente la mezcla se amasó y se dejó reposar a temperatura ambiente. Finalmente la masa fue moldeada y las masas fueron horneadas a temperatura de 175°C. El producto obtenido fue posteriormente cortado para su debida evaluación de textura y caracterización fisicoquímica. Inicialmente se analizaron las características fisicoquímicas del producto terminado, como lo son el % de humedad, pH y actividad de agua bajo los métodos reportados por la AOAC. La textura (extensibilidad) se evaluó con el accesorio *Pizza Tensile Rig* a una distancia apropiada, en seguida se aplica una fuerza llevando a cabo un estiramiento del producto, hasta que llega la ruptura del pan, obteniendo la fuerza (kg) de ruptura, fuerza a 2mm y el trabajo (kg.mm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este proyecto se presentan a continuación y corresponden a la caracterización fisicoquímica del pan tipo pizza desarrollado con la incorporación de fibra natural adicionada en diferentes porcentajes como sustituto de harina.

Tabla 1. Características Fisicoquímicas de las bases de pizza

Tratamiento	Humedad (%)	pH	Aw
Control	20.59 ± 1.54^{fg}	5.64 ± 0.04^{de}	0.89 ± 0.002^{e}
Tx1	19.24 ± 0.32^{ef}	5.67 ± 0.01^{ef}	0.90 ± 0.002^{f}
Tx2	9.71 ± 0.11^{a}	5.66 ± 0.01^{ef}	0.85 ± 0.001^{a}

Tx3	25.68	±	0.30^{i}	5.68	±	0.02^{f}	0.91	±	0.001^{g}
Tx4	15.67	±	3.26^{cd}	5.57	±	0.01^{ab}	0.86	±	0.003^{b}
Tx5	18.25	±	0.24^{de}	5.64	±	0.02^{bc}	0.88	±	0.001^{d}
Tx6	22.07	±	0.31^{gh}	5.63	±	0.01^{cde}	0.89	±	0.002^{e}
Tx7	13.94	±	0.06^{bc}	5.55	±	0.01^{a}	0.87	±	0.001^{c}
Tx8	11.48	±	0.50^{ab}	5.63	±	0.01^{cde}	0.90	±	0.002^{f}
Tx9	23.01	±	0.44^{hi}	5.61	±	0.02^{bcd}	0.87	±	0.001^{c}

Las diferentes letras muestran diferencias significativas (p< 0.05) por columna.

Los datos obtenidos de humedad, actividad de agua y pH de los diferentes tratamientos y la muestra control después de ser horneados arrojan que la humedad contenida, se encuentra en un rango de 9.71 -25.68%. La actividad de agua en un alimento es una de las características fisicoquímicas más importantes ya que esta determina la vida de anaquel de un producto, los resultados que se obtuvieron se encuentra en un rango de 0.85 a 0.91, siendo estos similares a los obtenidos para la muestra control. Los productos de panificación elaborados se encuentran en un rango de pH de 5.57 a 5.68.

Tabla 2. Textura de las bases de pizza

Muestra	Fuerza (kg)			Fuerza 2mm (kg)			Trabajo (kg. sec)		
Control	0.39	±	0.13^{ab}	0.29	±	0.15^{a}	0.30	±	0.06^{bc}
TX1	0.36	±	0.10^{ab}	0.22	±	0.11^{a}	0.37	±	0.07^{d}
TX2	0.50	±	0.17^{c}	0.26	±	0.18^{a}	0.71	±	0.20^{e}
TX3	0.37	±	0.14^{ab}	0.27	±	0.16^{a}	0.24	±	0.08^{ab}
TX4	0.43	±	0.10^{bc}	0.31	±	0.11^{a}	0.35	±	0.09^{cd}
TX5	0.37	±	0.12^{ab}	0.30	±	0.12^{a}	0.23	±	0.07^{a}
TX6	0.37	±	0.09^{ab}	0.30	±	0.08^{a}	0.25	±	0.07^{ab}
TX7	0.39	±	0.12^{ab}	0.25	±	0.17^{a}	0.40	±	0.15^{d}
TX8	0.36	±	0.10^{ab}	0.27	±	0.10^{a}	0.24	±	0.10^{ab}
TX9	0.33	±	0.09^{a}	0.25	±	0.10^{a}	0.21	±	0.08^{a}

Las diferentes letras muestran diferencias significativas (p< 0.05) por columna.

De acuerdo a la extensibilidad, este parámetro representa el valor de la fuerza aplicada hasta que la muestra llega a su máxima resistencia de ruptura. Se obtuvo que la base de pan tipo pizza es un producto suave, el tratamiento control presentó valores de fuerza de 0.39kg, la mayoría presentó

valores muy similares al control a excepción del tratamiento 2 que requirió una mayor fuerza de ruptura. La fuerza a 2mm de distancia con respecto al control no presentó diferencias significativas entre los tratamientos.

El tratamiento 4 y 6 generaron una fuerza mayor muy ligera a esta distancia. Mientras que el trabajo ejercido estuvo relacionado con la fuerza de ruptura, el control tuvo valores de 0.3 y la mayoría de los tratamientos generaron un trabajo cercano al control a diferencia de los tratamientos 5, 8 y 9 que generaron menor trabajo y el tratamiento 2 generó el mayor trabajo con respecto al control.
De acuerdo con lo reportado de textura en pan, Argüelles, V. (2008) reporta la textura de masa de pan de pizza con fibra también impacta en la fuerza pero del perfil de textura, mientras Díaz Malmierca, Á. (2013), reporta que para pan adicionado con fibra dietética constante, obtuvo una mayor rango en la textura de pan, pero por perfil de textura.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la elaboración de la base de pan tipo pizza con la adición de 3 tipos de fibra natural comercial incorporadas como sustituto de harina, se puede concluir que los productos obtenidos fueron obtenidos con características muy similares al control.
El porcentaje adicionado de fibra natural 2.5% a 7.5%, influyo de acuerdo al tipo de fibra y a la concentración utilizada debido que a mayor concentración de fibra esta tenia diferentes efectos en el pan tal es el caso de la obtención de mayor volumen al hornearse o mayor y menor fuerza y trabajo al obtener datos de textura instrumental.

Sin embargo, también se puede concluir que las características de los productos obtenidos de cada tratamiento muestran que la incorporación de fibra natural como sustituto de harina, tiene características un poco similares a la muestra control en cuanto a algunas características fisicoquímicas y por lo tanto son apropiadas para producir este tipo de productos panificados.

REFERENCIAS

[1] R. M. Comerio, «Influencia de la actividad acuosa sobre la producción de citrinina y deoxinivalenol en Trigo.,» Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires., (1998).

[2] H. G. R. O. C. T. R. &. D. l. T. M. Sánchez, «ELABORACIÓN DE PAN SIN GLUTEN CON HARINAS DE ARROZ EXTRUDIDAS ELABORATION OF BREAD WITHOUT GLUTEN FROM EXTRUDED RICE FLOURS.,» journal of Food, pp. 109-116, 2008.

[3] A. González Fuentes, « CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE FRUCTANOS DE AGAVE PARA SU USO COMO SUSTITUTOS DE GRASA EN ALIMENTOS.,» 2014.

[4] V. C. T. &. G. Y. Argüelles, «. Elaboración de pan pizza a partir de masa madre fresca y congelada, adicionado con inulina como prebiótico.,» Paper presented at the Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y III Foro de ciencia y tecnologia de los Alimentos, Ganajuato, Mexico, (2008) .

[5] Á. Díaz Malmierca, «Efecto de la incorporación de fibras dietéticas en la calidad de panes para celíacos,» (2013).

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA Y PASTA DE JATROPHA CURCA L. VAR. SEVANGEL PARA SU USO COMO POSIBLES INGREDIENTES FUNCIONALES EN LA DIETA.

[1]Olloqui-Pang, E., [1]Añorve-Morga, J., 1Castañeda-Ovando, A., [2]Evangelista-Lozano, S., [3]Alanís-García, E., [3]Ramírez-Moreno, E. y [4]Valadez-Vega, Ma.

1. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Carr. Pachuca-Tulancingo, km. 4.5. Mineral de la Reforma, Hgo., C.P. 42184.
2. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de Biotecnología. Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731, Apartado Postal 24
3. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Nutrición. Circuito Ex Hacienda La Concepción S/N. Carretera Pachuca-Actopan. San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo. México; C.P. 42160.
4. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Medicina. Instituto de Ciencias de la Salud Ex Hacienda la Concepción s/n Carr. Pachuca - Tilcuautla C.P. 42060 Tilcuautla, Hidalgo.

*Autor para correspondencia: mvzolloqui@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN
La semilla de Jatropha curcas se ha utilizado en la extracción de aceite para la transformación en biocombustible [1]. El subproducto de este procesamiento es la pasta, cuyo empleo en la alimentación es limitado debido a los ésteres de forbol que le confieren alta toxicidad. Sin embargo, existen variedades no tóxicas [2], que por su alto contenido en proteína y aporte energético pueden ser utilizadas en la suplementación de dietas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la semilla y la pasta de una variedad de jatropha (J. curcas L. var. Sevangel) mediante la cuantificación de sus nutrientes y componentes minoritarios para evaluar su posible uso en dietas. Para ello, se realizó un estudio bromatológico, perfil de ácidos grasos de cadena intermedia y larga, cuantificación de esteres de forbol y ácido fítico en la semilla y pasta de J. curcas var. Sevangel. La cuantificación de esteres de forbol permitió determinar que la semilla y la pasta son inocuas, debido a que no se detectaron estos tóxicos. En cuanto a su composición nutrimental, tanto la semilla como la pasta son ricas en fibra dietética, ya que presentaron valores de 29.4% y 33.4%, respectivamente. La grasa cruda fue mayor en la semilla (29.2%) que en la pasta (13.5%); sin embargo, el contenido de ácidos grasos insaturados fue mayor en el aceite obtenido de la pasta. El porcentaje de proteína cruda en la semilla fue de 18% y en la pasta de 32.2%. El ácido fítico (AF) se determinó como un compuesto secundario, debido a su acción quelante que puede disminuir la formación de cálculos renales [3]. La concentración de AF fue mayor en la semilla que en la pasta (8.1 vs 5.0 mg/mL). La pasta de Jatropha curcas L. var. Sevangel es una fuente rica en fibra, proteína y grasa cruda, en esta última destaca el contenido de ácidos grasos insaturados. Además, su concentración de ácido fítico puede favorecer su potencial como ingrediente funcional.

Palabras clave: Jatropha, perfil de ácidos grasos, fibra dietética, ácido fítico.

REFERENCIAS

[1] M. K. Ustra, J. R. Silva, M. Ansolin, M. Balen, K. Cantelli, I. P. Alkimim and M. L. Corazza, "Effect of temperature and composition on density, viscosity and thermal conductivity of fatty acid methyl esters from soybean, castor and Jatropha curcas oils", The Journal of Chemical Thermodynamics vol. 58, pp. 460-466, 2013.

[2] J. A. Félix-Bernal, M. A. Angulo-Escalante, A. Estrada-Angulo, J. B. Heredia, D. Muy-Rangel, M. A. López-Soto, and A. Plascencia, "Feeding value of nontoxic Jatropha curcas seed cake for partially replacing dry-rolled corn and soybean meal in lambs fed finishing diets". Animal Feed Science and Technology, vol. 198, pp. 107-116, 2014.

[3] J. R. Zhou, and J. W. Erdman Jr, "Phytic acid in health and disease". Critical Reviews in Food Science & Nutrition, vol. 35 no.6, pp. 495-508, 1995.

INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE LUZ EN EL CRECIMIENTO Y ABSORCIÓN NUTRIMENTAL DE LECHUGA TIPO BABY BAJO SISTEMA DE PRODUCCIÓN FÁBRICA DE PLANTAS.

[1]Díaz-Corona, D.A., [2]López-López, M.E., [1]Ayón-Reyna, L.E., [1,2]López-Valenzuela, J.A. y [1,2]Vega-García, M.O. [1]Avendaño-Abarca, V.H., [2]Rodríguez-Fuentes, H., [1]Luna-Maldonado, A.I., [1]Vidales-Contreras, J.A.; [1]Márquez-Reyes, J.M. y [2]Munguía-López, J.P.

1. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. Francisco Villa s/n, Col. Ex−Hacienda "El Canadá", C.P. 66050, General Escobedo, Nuevo León.
2. Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna No. 140, Col. San José de los Cerritos, C.P. 25294 Saltillo, Coahuila.

*Autor para correspondencia: victor_havendano@hotmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
Esta investigación preliminar se realizó en el Laboratorio de Sistema de Producción en Ambiente Controlado ubicado en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la que se determinaron los efectos de la intensidad de luz en el crecimiento del cultivo de lechuga Sucrine tipo Baby, los tratamientos establecidos fueron dos: 120 y 190 µmol·m-2·s-1 de intensidad de luz provistos por lámparas de diodos emisores de luz, cada uno con 21 repeticiones y una unidad experimental de 1 planta. Las variables evaluadas fueron peso fresco y seco de raíz-hojas y absorción total de nutrientes (P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn y Zn). Los resultados muestran diferencias estadísticas en peso fresco de raíz, parte aérea y total de planta, en cuanto peso seco solamente se presentó diferencia en la parte radicular. Para el caso de concentración nutrimental los datos muestran niveles bajos de potasio (< 7.5%), calcio (< 2.0 %) y magnesio (< 0.5 %), niveles altos para fierro (> 100 mg·kg-1), cobre (> 25 mg·kg-1) y manganeso (> 250 mg·kg-1) y nivel suficiente para fósforo (0.5-1.0 %) y zinc (25 a 250 mg·kg-1).

Palabras clave: *Lactuca sativa* L., control de luz, ambiente controlado, hidroponía.

REFERENCIAS

[1] Almaguer-Sierra, P., Rodríguez-Fuentes, H., Barrientos Lozano, L., Mora Ravelo, S. G., & Vidales-Contreras, J. A. (2014). Relación entre grados-día y la producción de Opuntia ficus-indica para consumo humano en Marín, Nuevo León. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 5(6), 1055-1065.

[2] Arellano-García, M., Valera-Martínez, D., Urrestarazu-Gavilán, M., Quezada-Martín, M., Murguía-López, J., & Zermeño González, A. (2011). Ventilación natural y forzada de invernaderos tipo Almería y su relación con el rendimiento de tomate. Terra Latinoamericana, 29, 379-386.

[3] Choi, K. Y., & Lee, Y.B. (2004). Effect of air temperature on tipburn incidence of butterhead and leaf lettuce in a plant factory. Journal of the American Society for orticulturae, 907, 87–90.

EL SILICIO AUMENTA LA VIDA POSCOSECHA DE FRUTOS DE *Solanum lycopersicum* L.

*Carballo-Méndez, F.J., Olivares-Sáenz, E., Váquez-Aalvarado, R.E., Zavala-García, F. y Sánchez-Alejo, E.J.

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Av. Francisco Villa, Ex Hacienda el Canadá, C.P. 66450. General Escobedo, Nuevo León, México.

*Autor para correspondencia: ing.fercarballo@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El silicio (Si) es un elemento mineral considerado como benéfico para las plantas, sobre todo las sometidas a algún tipo de estrés. El Si mejora el crecimiento, desarrollo, producción de las plantas, además de incrementar la calidad de los productos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la salinidad, el silicio y la interacción entre ellos, en la vida poscosecha de frutos de tomate. El ensayo se realizó en el Centro de Agricultura Protegida de la Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el municipio de General Escobedo, N. L. En el experimento se evaluaron 9 tratamientos: tres niveles de conductividad eléctrica (2, 5 y 8 dSm-1, ajustada con cloruro de sodio) y tres niveles de silicio (0, 60 y 120 ppm, utilizando como fuente silicato de potasio). El ensayo se estableció en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x3, con tres repeticiones. Las variables evaluadas fueron: pérdida de peso y maduración (colorimetría). Los frutos evaluados correspondieron al periodo medio de la cosecha. Las condiciones de almacenamiento fueron temperatura entre 20 y 25°C y humedad relativa entre 50 y 70%. Las suposiciones del análisis de varianza fueron analizadas con la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas y con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para normalidad. La transformación arco seno fue utilizada para los datos obtenidos en porcentaje. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 22.0 [1], en las variables donde se encontró diferencia significativa, se realizó una comparación de medias con el método DMS ($P<0.05$), utilizando el Paquete de Diseños Experimentales de la FAUANL [2]. La salinidad no tuvo efecto en la pérdida de peso de los frutos. El Si redujo la pérdida de peso de los frutos en un 5% cuando se agregan 60 ppm de este elemento a la solución nutritiva. En la maduración de los frutos el Si redujo dicho proceso en condiciones bajas y altas de salinidad. En conclusión, el Si puede contribuir a alargar la vida poscosecha de frutos producidos en condiciones óptimas de producción e incluso bajo condiciones de estrés salino.

Palabras clave: tomate; pérdida de peso; maduración.

REFERENCIAS

[1] IBM Corp. Released. (2013). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

[2] Olivares, S.E. 2015. Paquete de diseños experimentales. Versión 1.6. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. General Escobedo, Nuevo León, México.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEMILLAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum)*.

[1]Mateo-Roque, P., [1]Cruz-Morán, Y.J., [1*]Luna-Suarez, S.

1. Centro de investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México.

*Autor para correspondencia: silvials2004@yahoo.com.mx

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN

Solanum lycopersicum, es uno de los cultivos hortícolas más importantes del mundo, su fruto puede consumirse fresco o procesado. La pasta de tomate es uno de los productos de salida que genera orujo (mezcla de cascaras y semillas). Si el orujo no recibe un tratamiento de almacenamiento adecuado, puede ocasionar problemas de contaminación ambiental. Se ha reportado que las semillas del tomate contienen el 25% de proteínas, mismas que pueden ser aprovechadas para beneficio de la industria alimentaria. El objetivo del presente trabajo es estandarizar un método de extracción de proteínas a partir de semillas de tomate. Es por ello que se analizó el efecto que ejerce el desgrasar la harina de semilla de tomate sobre el rendimiento de extracción de proteínas totales. Los tratamientos de extracción de proteína se llevaron a cabo con 2 álcalis. Se utilizó 1M de NaCl a pH 8 ajustado con NaOH y 0.001M de $Ca(OH)_2$ a pH 10. El resultado observado fue que la el tratamiento con NaOH-NaCl extrajo 60% de las proteínas totales, mientras que el $Ca(OH)_2$ extrae el 20%.

Palabras clave: Tomate; proteína; álcalis.

INTRODUCCIÓN

Solanum lycopersicum Lam*,* conocido como tomate o jitomate en México, es una planta de la especie del género *Solanum,* perteneciente a la familia Solanaceae [1]. En particular, el 90% de la producción mundial se produce en el hemisferio norte (zona mediterránea, California y China). Aunque el tomate se cultiva en más de 100 países, tanto para consumo fresco como para procesamiento industrial, los 10 principales productores representan más del 80% de la producción mundial, algunos de ellos son Estados Unidos y China, etc. [2].

La planta del tomate produce un fruto, el cual es una baya que presenta formas muy variadas; al fruto también se le llama tomate como la planta [3]. Al menos un tercio de los tomates se consumen en forma de productos procesados como jugo de tomate, pasta, ketchup y salsa, etc. [4]. Las industrias alimentarias generan cantidades sustanciales de residuos, cuando no se utilizan, se convierten en residuos que contribuyen a problemas de eliminación y agravan la contaminación ambiental. Por ejemplo, un almacenamiento sin control de algunas biomasas residuales podría producir metano, teniendo un fuerte efecto invernadero. Entre las industrias alimentarias, la industria de la fabricación de pasta de tomate es una de las principales.

Los residuos sólidos se derivan tanto de la producción como del proceso del tomate. Así mismo, se producen residuos orgánicos a partir del descarte de la línea de producción donde se considera defectos de la materia prima entrante, tales como tomates inmaduros o pigmentación seriamente defectuosa, tomates dañados por causas mecánicas o por acción microbiana [5].

Las unidades de fabricación de pasta de tomate generan 7.0-7.5% de residuos sólidos y del 71-72% de estos residuos son de orujo [6]. El orujo de tomate se compone principalmente de cascaras y semillas. Es un sustrato lignocelulósico, disponible en grandes cantidades en los países mediterráneos y que a menudo crea problemas de eliminación. Las semillas de tomate pueden ser separadas de la pulpa y la piel por un sistema de sedimentación luego y utilizadas posteriormente [7].

Se ha reportado que la semilla de tomate es el principal subproducto durante la fabricación de pasta de tomate con el 73.8% del total de orujo generado y de cáscara el 26.2%, respectivamente [8]. Este material se elimina actualmente como desecho sólido o se utiliza como alimento para animales, pero la abundancia de compuestos bioactivos en los subproductos sugiere la posibilidad de utilizarlos como una fuente barata de diferentes compuestos bioactivos e ingredientes funcionales de alto valor [9].

Se ha reportado que las semillas de tomate contienen aproximadamente del 25-30% de proteína cruda y un alto contenido de ácido glutámico y aspártico. Así mismo, también se ha informado que las semillas de tomate presentan una mejor fuente de proteína en comparación con otras fuentes alternativas, ya que no hay factores antinutricionales o componentes nocivos encontrados en las semillas de tomate [10].

En las últimas dos décadas, se han estudiado algunas características y propiedades funcionales que presentan las proteínas de las semillas de tomate, así como posibles usos en la industria alimentaria. De acuerdo a lo anterior, las semillas de tomate son una fuente rica en proteínas, éstas pueden ser aprovechadas para beneficio de la industria alimentaria y en conjunto, reducir los residuos sólidos generados que afectan al medio ambiente. El objetivo del presente trabajo es estandarizar un método para la extracción de proteínas a partir de semillas de tomate. Para ello se analizó el efecto que ejerce el desgrasar la harina de semilla de tomate sobre el rendimiento de extracción de proteínas totales y hacer la extracción de proteínas mediante álcalis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron semillas de tomate que venían mezcladas con pulpa, posteriormente fueron separadas y secadas al aire a temperatura ambiente de 25°C. Se adquirieron reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS PAGE) de Bio-Rad. Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica. Se utilizó agua destilada como disolvente en todos los experimentos.

Preparación de harina

Se separaron las semillas de tomate y se limpiaron de la pulpa utilizando agua. Posteriormente se secaron al aire a temperatura ambiente durante 24 horas. Para el caso de la harina desgrasada, se utilizó la técnica de extracción de grasa descrita anteriormente [7] con algunas modificaciones; las semillas secas se molieron utilizando un molino KRUPS GX4100. A continuación se extrajo aceite de las semillas de tomate con éter etílico utilizando un extractor Soxhlet. El disolvente se eliminó con un rotavapor

Heidolph WB2001 y se recogió aceite de semilla de tomate. La harina sin degrasar y desgrasada fueron preparadas con buffer de carga que contenía β-mercaptoetanol y desnaturalizadas a 95°C. En seguida se realizó la determinación del perfil proteico mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%.

Extracción de proteína con NaCl-NaOH

Para extraer la proteína, se mezcló una muestra de harina de semilla de tomate de 0.2 g con 2 ml de 1M de NaCl, se ajustó el pH a 8, usando NaOH 0.1 N. Posteriormente se agitó la mezcla en un agitador rotatorio de tubos SRT6 durante una hora a temperatura ambiente. Después de agitar, se centrifugó la suspensión en una centrifuga 24D Labnet a 13,000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se recogió y se le cuantifico proteínas mediante la técnica de BCA [11].

La solución de proteína se mezcló con buffer de carga para SDS-PAGE. Las muestras se calentaron en un termomixer durante 6 min a 95°C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Las muestras anteriores se cargaron en el gel y se dejaron correr a 110 voltios hasta que el colorante de seguimiento alcanzó el fondo del gel. El gel se retiró, se tiñó durante la noche con solución de tinción Coomassie, se eliminó el colorante extra mediante lavados repetidos usando solución de desteñido. El contenido de proteínas se evaluó mediante el método de Kjeldahl utilizando un factor de conversión de proteínas de 6,25 (m 978,04AOAC) (AOAC1990). El rendimiento de proteína se definió como la proporción entre la proteína total extraída y la proteína total de la semilla. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Extracción de proteína con $Ca(OH)_2$

Para extraer la proteína, se mezcló una muestra de harina de semilla de tomate de 0.2 g con 2 ml de 0.001M de $Ca(OH)_2$, el a pH se ajustó a 10 usando $Ca(OH)_2$ 0.1 N. Posteriormente se agitó la mezcla en un agitador rotatorio de tubos SRT6 durante una hora a temperatura ambiente. Después de agitar, el sobrenadante fue separado de la pastilla y se continuó el proceso como se ha descrito anteriormente.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de proteína

Se determinó que las semillas de tomate contienen el 24.26 ± 1.00 % de proteína por cada 100g de semilla en base seca. Este resultado es comparable con niveles reportados anteriormente, [12] con el 25% de proteína, entre otros autores.

Determinación del perfil proteico mediante electroforesis gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) de harina desgrasada y sin desgrasar

En el SDS-PAGE (figura 1) del carril 1, se observó que la harina sin desgrasar presentó mayor contenido de proteína, comparada con la harina desgrasada (carril 2), debido a que la harina intacta tiene 4 bandas en el intervalo 20-15 KDa, caso contrario con la harina libre de grasa, esta sólo presentó dos bandas en el rango antes mencionado. Por otro lado, bandas por debajo de 50 KDA y el rango de 37-25 KDa, presentaron disminución de su intensidad. Por lo tanto, podría sugerirse que, al llevarse a cabo la extracción de grasa, hay proteínas que se pierden. Además, el perfil proteico de la harina intacta, es similar al reportado anteriormente [10] del aislado de proteína de semilla de tomate.

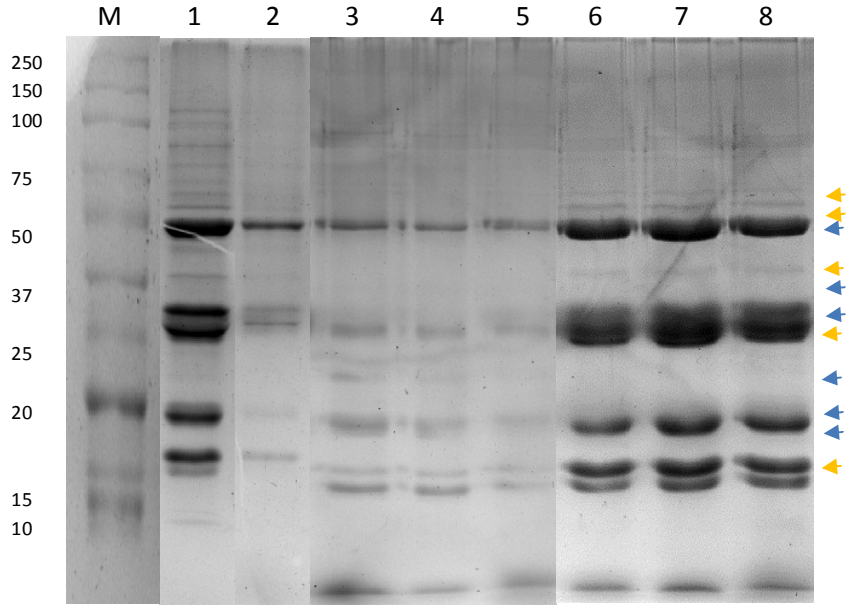


Figura 1. SDS-PAGE Marcador de pesos molecular Precision Plus Protein Standards (1), harina sin desgrasar (2), harina libre de grasa; proteína soluble en medio 0.001M $Ca(OH)_2$ pH10 (3-5); proteína soluble en medio 1M NaCl pH8 (6-8). Flecha azul, proteínas de mayor abundancia y flecha naranja, proteínas de menor abundancia.

Rendimiento de proteína extraída

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que el tratamiento de 1M de NaCl pH8 extrae el 60% de proteínas totales, las cuales corresponden con el perfil electroforético del SDS-PAGE (figura 1, carril 4-6), sin embargo en el tratamiento 0.001M de $Ca(OH)_2$, el porcentaje de extracción es aproximadamente el 15% de proteínas totales.

El peso molecular se determinó con el software Image Lab™ Bio-Rad. En ambos tratamientos se observó el rango de peso es de 49-10 KDa. Estos resultados son similares a trabajos anteriores [10], sin embargo, ellos solo extraen 5 bandas características y en esta investigación, se observaron 11 representativas.
Estos estos estudios también sugieren compuestos monovalentes (NaCl y NaOH) extraen con mejor eficiencia proteínas, comparado con las divalentes. Sin embargo, también puede influir el punto isoeléctrico (P.I) de las proteínas presentes, debido a que si presentan un P.I por debajo del pH de la solución de extracción, las proteínas se cargan negativamente, ocasionando una repulsión entre ellas y alta solubilidad en el medio.

Si se comparan los carriles de ambos tratamientos, y considerando que ambos presentaron pH alcalino, se podría sugerir que el pH no interfiere en la extracción de proteínas, sino el NaCl presente en el medio.

CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio realizado, se puede concluir lo siguiente: la harina no desgrasada contiene mayor número de proteínas que la desgrasada, el 60% de proteínas totales son solubles en NaCl 1Ma pH 8, lo que podría sugerir que son globulinas.

REFERENCIAS

[1] L. T.K, «Solanum lycopersicum,» Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, vol. 6, pp. 339-363, 2013.

[2] A. R. Celma, F. Cuadros y F. López-rodríguez, «Characterisation of industrial tomato by-products from infrared drying process,» Food and Bioproducts Processing, vol. 7, pp. 282-291, 2009.

[3] FAO, de El cultivo protegido en clima mediterráneo, Roma, 2002, pp. 1-318.

[4] D. Shao, G. G. Atungulu y Z. Pan, «Characteristics of Isolation and Functionality of Protein from Tomato Pomace Produced with Different Industrial Processing Methods,» Food Bioprocess Technol, 2013.

[5] G. Rossini, G. Toscano, D. Duca, . F. Corinaldesi, E. F. Pedretti y G. Riva, «Analysis of the characteristics of the tomato manufacturing residues finalized to the energy recovery,» Biomass and Bioenergy, vol. 51, pp. 177-182, 2013.

[6] D. S. Sogi, . M. S. Arora, S. K. Garg y A. S. Bawa, «Fractionation and electrophoresis of tomato waste seed proteins,» Food Chemistry 76, vol. 76, pp. 449-454, 2002.

[7] e. a. P. Giannelos, «Physical, chemical and fuel related properties of tomato seed oil for evaluating its direct use in diesel engines,» INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS, pp. 193-194, 2005.

[8] A. Sarkar y P. Kaul, «EVALUATION OF TOMATO PROCESSING BY-PRODUCTS :,» Journal of Food Process Engineering , vol. 37, pp. 299-307, 2014.

[9] e. a. A. N. Grassino, «Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor,» Food Hydrocolloids, pp. 265-274, 2016.

[10] A. Sarkar, H. Kamaruddin, A. Bentley y S. Wang, «Food Hydrocolloids Emulsion stabilization by tomato seed protein isolate : In fl uence of pH , ionic strength and thermal treatment,» Food hydrocolloids, vol. 57, pp. 160-168, 2016.

[11] H. G. Arellano y R. Vázquez Duhalt, «Cuantificación de proteínas: una revisión,» Biotecnología, vol. 3, 1998.

[12] M. E. Persia, C. M. Parsons, M. Schang y J. Azcona, «Nutritional Evaluation of Dried Tomato Seeds,» Poultry Science , p. 141–146, 2003.

[13] H. Al-wandawi, . M. Abdul-rahman y K. Al-shaikhly, «Tomato Processing Wastes as Essential Raw Materials Source,» Journal of Agricultural and Food Chemistry , vol. 33, nº 5, pp. 804-807, 1985.

CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL Y PERFIL VOLÁTIL DE GUSANO ROJO DE MAGUEY (*Comadia redtenbacheri*) COLECTADO EN EL ESTADO DE HIDALGO.

*Estarrón-Espinosa, M., Morales-Hernández, N., Fernández-Flores, O.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Unidad de Tecnología Alimentaria, Camino el Arenero 1227, Col. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México 45019.

*Autor para correspondencia: mestarron@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El consumo de insectos en México ha sido documentado desde épocas prehispánicas, principalmente en los estados del Centro, Sur y Sureste de nuestro país en donde actualmente se contabilizan cerca de 500 especies comestibles. El gusano de rojo de maguey (*Comadia redtenbacheri*), también conocido como chinicuil, figura en la lista de los insectos más utilizados en la gastronomía tradicional mexicana y es consumido, además de su alto valor nutritivo, por su olor y sabor delicado y exquisito. El objetivo de este trabajo fue evaluar la composición nutricional y volátil relacionada con la calidad del gusano rojo de maguey. Los resultados obtenidos mostraron un alto contenido de grasa y proteína, 24.3% y 12.6% respectivamente. En la fracción lipídica del insecto, se identificaron 12 ácidos grasos de los cuales, el 66.09% correspondió a ácidos ω-9 (oleico y eicosenoico), 2.16% a ω-6 (linoleico) y sólo un 0.07% a ω-3 (α-linolénico). En cuanto a la fracción volátil del gusano rojo deshidratado, fue abundante la concentración de ésteres, alcoholes, ácidos y compuestos misceláneos. La caracterización de insectos comestibles en varios aspectos relacionados con su calidad, constituye una herramienta clave para valorizar su producción, consumo y alternativas de transformación.

Palabras clave: Gusano rojo; chinicuil; *Comadia redtenbacheri*; caracterización.

INTRODUCCIÓN

La práctica de comer insectos ha sido documentada desde tiempos remotos en nuestro país; en los aztecas y en general en las culturas prehispánicas, los insectos han formado parte importante de la cultura gastronómica. A lo largo de nuestro territorio, se contabilizan cerca de 500 especies de insectos comestibles, por lo que México es considerado uno de los países con mayor diversidad de éstos, destacando chinches, pulgones, libélulas, escarabajos, hormigas, abejas, jumiles, escamoles, gusanos de maguey y chapulines, siendo estos últimos tres insectos los de mayor consumo, principalmente en la región centro y sur-sureste de México y particularmente en los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Querétaro, San Luís Potosí, Jalisco, Oaxaca, Chiapas, Distrito Federal y Estado de México [1].

El gusano rojo de maguey (*Comadia redtenbacheri*) conocido comúnmente con el nombre de chinicuil, pertenece a la orden lepidóptera de la familia Cossidae y es también conocido con algunas sinonimias como *Bombyx agavis*, *Hypopta agavis* e *Hypopta redtenbacheri*. Este insecto representa el 18% en el consumo mundial quedando en segundo lugar superado solamente por los escarabajos [2]. El gusano

rojo de maguey, como todos los insectos, tiene un ciclo de vida específico. Se desarrolla en varios de los agaves conocidos de México como el *Agave salmiana* y *A. angustifolia*; anidado en estas especies, el gusano rojo de maguey alcanza su máximo desarrollo en la tercera muda con una longitud de aproximadamente 4 centímetros, caracterizándose en esta etapa por su color rojo intenso y su aroma penetrante, por lo que se considera este el momento ideal para consumirse, justo antes de convertirse en palomilla.

Este insecto se consume en México por tradición, por su riqueza nutrimental y por su sabor. Constituye parte de los platillos tradicionales como los tlacoyos rellenos de gusano rojo frito, quesadillas rellenas de gusanos fritos, los sopes o tacos condimentados con gusano de maguey, salsa con gusano rojo, etc. Sin embargo, en la actualidad este insecto también es ofrecido en restaurantes de prestigio en otras partes del mundo como un platillo *gourmet* [3]. Entre los beneficios de los insectos como fuente alimenticia, destacan principalmente su alto aporte de proteínas y grasas, minerales, vitaminas, así como su contenido en aminoácidos esenciales [4, 5, 6, 7]. En particular, este insecto tiene además un atractivo sensorial natural generado en parte por su composición volátil, la cual es acentuada durante su preparación. Estudios recientes, han documentado la calidad del gusano rojo de maguey de algunos estados de México a partir de su contenido nutrimental [6, 8, 9, 10], sin embargo existe poca información relativa a la composición de los ácidos grasos de su fracción lipídica, así como sobre los componentes asociados a su aroma característico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la composición nutricional y volátil relacionada con la calidad del gusano rojo de maguey de una localidad del estado de Hidalgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Los gusanos rojos de maguey silvestre fueron colectados en el municipio de Zapotlán de Juárez, Hidalgo. Fueron lavados con agua purificada y escaldados durante 3 min a una temperatura de 90°C. Posteriormente fueron sometidos a choque térmico sumergiéndolos en un baño de hielo durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se escurrieron hasta eliminar la humedad residual y una fracción de éstos fue envasada al vacío previo a su análisis bromatológico. Otra parte de los gusanos escaldados y escurridos fue secada en un horno de convección forzada de aire caliente a 60°C durante 5h, y finalmente envasados al vacío y colocados en un frasco hermético para su análisis cromatográfico.

Determinaciones bromatológicas

La caracterización bromatológica del gusano rojo de maguey, consistió en el análisis del contenido de proteínas, grasas, carbohidratos totales, cenizas, fibra cruda y humedad de acuerdo a las metodologías especificadas para alimentos [11].

Análisis cromatográfico

Determinación de ácidos grasos. Se efectuó a partir de la grasa obtenida mediante extracción con soxhlet, y posterior conversión a metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) utilizando BF_3, de acuerdo al procedimiento descrito en [12]. Los FAMES fueron separados en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890B acoplado a un detector de masas 5977A (GC-MS), utilizando una columna HP-23 cis/trans (60m x 0.25nm ID x 0.25µm ft), inyectando 0.5 µL de la muestra metilada en un flujo de 1.3 ml/min de He. El programa se temperatura en el horno fue programado a 40°C durante 5 min, después se incrementó 25°C/min hasta 180°C manteniendo 30min y finalmente se elevó 5°C/min hasta 250°C,

manteniendo 5 min. El inyector y detector se mantuvieron a 250°C y 260°C, respectivamente. La ionización se efectuó a 70eV por EI. La identificación de los ácidos grasos fue obtenida a partir de la comparación de espectros de los picos de la muestra con los de la biblioteca NIST14, así como por los espectros y tiempos de retención de una mezcla de compuestos puros conteniendo ácidos grasos saturados e insaturados desde C_4-C_{24} (SIGMA-ALDRICH, pureza >95%). La cuantificación de los ácidos grasos fue basada en porcentaje de área.

Caracterización del perfil volátil. Los compuestos volátiles relacionados con el aroma del gusano rojo de maguey fueron determinados por microextracción en fase sólida seguida de su desorción y separación en un cromatógrafo de gases (HS-SPME-GC-MS). 1g de muestra deshidratada y molida se colocó en un vial de 22 ml adicionando 3 ml de agua grado HPLC exenta de aromas y se selló. El vial fue colocado en baño térmico a 45°C agitando durante 15 min. Los componentes volátiles fueron extraídos en una fibra de SPME (50/30 μm Carboxen/ DVB/PDMS, Supelco) durante 30 min a 45°C. Posteriormente, los componentes fueron desorbidos durante 7 min a 250°C en el sistema cromatográfico (GC-MS) descrito anteriormente. La separación de los compuestos extraídos se efectuó en una columna HP-INNOWAX de 60m x 0.250 mm ID x 0.25 μm ft, con un flujo de He de 0.8 ml/min. La temperatura inicial del horno fue de 40°C durante 3 min, después se elevó a 220°C con incrementos de 3°C/min manteniendo 3 min y finalmente se elevó a 250°C a razón de 10 °C/min manteniendo 15 min. La temperatura del detector fue mantenida a 260°C operando 70eV para la ionización de los componentes en modo EI. La identificación tentativa de los componentes separados se realizó en base a biblioteca de espectros NIST14, así como estándares de algunos compuestos puros disponibles, mientras que la cuantificación relativa se hizo en base a las unidades de área de cada pico identificado. La extracción de los componentes volátiles en las muestras y su respectivo análisis cromatográfico fueron realizados por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización bromatológica

La composición nutricional del gusano rojo de maguey, se caracterizó por presentar un alto contenido en proteínas y grasas con porcentajes en peso de 12.60% y 24.32%, respectivamente. Además se determinó un contenido de carbohidratos totales de 4.36% en peso, un 0.81% en peso de cenizas, 1.73% en peso de fibra cruda y una humedad del 57.88% en peso. Los contenidos de proteína y grasas en el gusano rojo de maguey colectado en el estado de Hidalgo, se encuentra dentro de los rangos reportados para este insecto en varias regiones de México [6, 8, 9,10,], las diferencias en los valores determinados en este estudio, podrían atribuirse a varios factores, entre ellos el origen geográfico de la colecta y el estadío de las larvas entre otros.

Perfil de ácidos grasos

En la Tabla 1, se resume el contenido de ácidos grasos identificados en la fracción lipídica del gusano rojo de maguey. El 87.7% de la composición total fue aportada por el ácido oleico y el ácido palmítico. El contenido total de los ácidos grasos ω-3 en la muestra se estableció en un 0.07% para el ácido α-linolénico, 2.16% para el ácido linoleico (ω-6) y 66.09% para los ácidos oleico y eicosenoico (ω-9).

Tabla 1. Composición de la grasa del gusano rojo de maguey

Ácido graso	%	Nomenclatura
Laurico	0.06	C12:0
Mirístico	0.27	C14:0
Miristoleico	0.11	C14:1
Palmítico	21.66	C16:0
Palmitoleico	0.63	C16:1
Estéarico	3.66	C18:0
Oleico	66.05	C18:1 n9
Linoleico	2.16	C18:2 n6
α-Linolénico	0.07	C18:3 n3
Araquídico	0.10	C20:0
11-Eicosenoico	0.04	C20:1 n9
Behénico	0.15	C22:0
Σ Saturados	*25.90*	
Σ Monoinsaturados	*66.83*	
Σ Poliinsaturados	*2.23*	
ω-3	*0.07*	
ω-6	*2.16*	
ω-9	*66.09*	

Se han reportado altos contenidos de ω-3 en la grasa de insectos comestibles, sin embargo no se encontraron coincidencias en los valores detectados para este tipo de ácidos en el gusano rojo analizado. Sin embargo, el alto contenido de ácido oleico coincide con los señalamientos sobre la importancia de la grasa de insectos comestibles por su alto contenido en ácidos grasos insaturados [7, 13]. Al ácido oleico se le ha asociado con un efecto hipotensor y disminución del riesgo de padecer artritis reumatoide; además su consumo se ha relacionado con la disminución de los triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la sangre, previniendo el desarrollo de padecimientos cardiovasculares, por lo que estos efectos positivos se suman a la ingesta de este insecto dado el alto contenido de este ácido monoinsaturado en su grasa.

Perfil volátil del gusano rojo

En la fracción volátil relacionada con el aroma del gusano rojo de maguey se identificaron tentativamente 43 compuestos, los cuales fueron clasificados en diferentes grupos funcionales de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes en la fracción volátil del gusano rojo (*Comadia redtenbacheri*)

Compuesto Volátil	Unidades de Área (10^5)	Compuesto Volátil	Unidades de Área (10^5)
ÁCIDOS		***ÉSTERES***	
Ácido acético	238.51	(Z,E)-9,12-Tetradecadienil acetato	345.47
Ácido isovalérico	36.63	(E)-9-Tetradecenil acetato	218.81
Ácido hexadecanoico	13.97	Metil acetato	271.75
Ácido octanoico	4.62	(Z)-5-Tetradecenil acetato	220.15
Ácido hexanoico	4.80	Metil salicilato	27.26
ALCOHOLES		Tetradecil acetato	18.71
(6Z,9Z)-Pentadecadien-1-ol	146.93	2-Etilhexil acetate	14.50
(Z)-9-Tetradecen-1-ol	81.34	Metil o-anisate	9.73
3-Metil-3-Buten-2-ol	tr	Metil hexadecanoato	3.41
(Z)-11-Tetradecen-1-ol	114.17	***PIRAZINAS***	
ALCANOS		2,6-Dimetil-pirazina	9.41
Undecano	18.23	2,5-Dimetil-pirazina	9.79
Dodecano	25.66	Metil pirazina	10.70
Tetradecano	18.11	2-Etil-5-metil- pirazina	4.10
Decano	16.11	2,3,5-Trimetilpirazina	3.53
2,6,10-Trimetil dodecano	11.33	Etil pirazina	2.86
Tridecano	7.14	***TERPENOS***	
2,5-Dimetil-nonano	3.41	D-Limoneno	113.18
ALDEHIDOS Y CETONAS		p-Cimeno	42.14
Isovaleraldehído	21.84	δ- 3-Careno	6.71
Benzaldehído	11.57	***COMPUESTOS MISCELANEOS***	
Octanal	5.41	2-Pentil-furano	6.39
3-Heptanona	4.27	2-Acetilpirrol	19.92
Isobutanal	6.26	1,4-Dicloro benceno	28.15
		Oxime-, metoxi-fenil-	142.04

tr: denota compuesto a nivel de trazas

Se detectó una mayor concentración de ésteres, seguido por alcoholes, ácidos, terpenos y otros componentes diversos. De manera individual, las mayores concentraciones correspondieron a los ésteres (Z, E)-9,12-tetradecadienil acetato, (E)-9-tetradecenil acetato, metil acetato y (Z)-5-tetradecenil acetato. El ácido acético, presentó una concentración importante, lo mismo que los alcoholes (6Z, 9Z)-pentadecadien-1-ol, (Z)-9-tetradecen-1-ol y (Z)-11-tetradecen-1-ol.

Por otra parte, entre los terpenos se detectó mayormente al limoneno y p-cimeno; asimismo el componente oxime-, metoxi-fenil destacó por su concentración entre los compuestos fenólicos. Seis pirazinas fueron identificadas en la fracción volátil del gusano rojo de maguey, y aunque su

concentración fue baja, al igual que los aldehídos detectados, sensorialmente se caracterizan por presentar un alto umbral de percepción a bajas concentraciones. La sinergia entre los componentes volátiles detectados tanto a concentraciones altas como bajas, sean propios del insecto o los generados durante el tratamiento térmico (escaldado y secado), crean sin duda el equilibro que otorgan a este insecto comestible el olor y sabor exquisito que lo coloca entre los insectos comestibles preferidos no sólo en la gastronomía nacional, sino internacional.

CONCLUSIONES

En este estudio se evaluaron aspectos relacionados con la calidad del gusano rojo de maguey que aportan información valiosa para valorizar su producción y consumo por su alto valor nutricional. Componentes volátiles que aportan un olor y sabor agradable y característico, así como su alto contenido de proteína y ácido oleico en la fracción lipídica, hacen de este insecto un alimento atractivo y exquisito para cualquier paladar.

REFERENCIAS

[1] C. Llanderal-Cázares, H. M. Santos Posadas, I. Almanza-Valenzuela, R. Nieto-Hernández & C. Castillejos Cruz, "Establecimiento del gusano rojo en plantas de maguey en invernadero", *Acta zoológica mexicana*, vol. 26, no. 1, pp. 25-31, 2010.

[2] A. Van Huis, J. Van Itterbeeck, H. Klunder, E. Mertens, A. Halloran, G. Muir and P. Vantomme, "Edible insects. Future prospects for food and feed security". *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), 2015.

[3] J. A. Aguilar, "¿Corre o vuela? ¡A la cazuela! Insectos comestibles", Alimentación y nutrición,Available:http://www.profeco.gob.mx/revista./publicaciones/adelantos_03/insec_comes_sep03.pdf.

[4] J. Ramos Elorduy, J. M. Pino M., "Contenido de vitaminas de algunos insectos comestibles de México", Journal of the Mexican Chemical Society, pp. 66-76, 2001.

[5] J. Ramos Elorduy, J. Muñoz, J.M. Pino, "Determinación de minerales en algunos insectos comestibles de México", *Journal of the Mexican Chemical Societ*y, vol.42, no. 1, pp. 18-33, 1998.

[6] J. Ramos Elorduy ans J. Pino Moreno, "Insectos comestibles del Estado de México y determinación de su valor nutritivo", *Anales del Instituto de Biología serie Zoología*, vol. , no.1, pp. 65-104,1998.

[7] J. Ramos-Elorduy B. and J. L. Viejo Montesinos, "Los insectos como alimento humano: Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México", Boletín de la *Real Sociedad Española de Historia Natural*, vol. 102, no. 1-4, pp. 61-84, 2007.

[8] J. Ramos-Elorduy, J. M. Pino-Moreno and J. Morales, "Análisis químico proximal vitaminas y nutrimentos inorgánicos de insectos consumidos en el Estado de Hidalgo, México". *Folia entomologica mexicana*, vol. 41, no. 1, pp. 15-29, 2002.

[9] J. Ramos-Elorduy, J. M. Pino-Moreno, E.E. Prado, M. A Perez, J. L. Otero, and O. L. De Guevara, "Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca, Mexico". *Journal of food composition and analysis*, vol. 10, no.2, pp. 142-157, 1997.

[10] B. Ramos Rostro, B. Quintero Salazar, J. Ramos-Elorduy, J.M. Pino Moreno, S.C.Ángeles Campos, A. García Pérez, V.D. Barrera García, "Análisis químico y nutricional de tres insectos comestibles de interés comercial en la zona arqueológica del municipio de San Juan Teotihuacán y en Otumba, en el estado de México", *Interciencia*, vol. 37, no. 12, pp. 914-920, 2012.

[11] *Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemist*s. 19th Edition, 2012.

[12] NMX-F-017-SCFI-2011 ALIMENTOS – "Aceites y Grasas - Determinación de la Composición de Acidos Grasos por Cromatografía de Gases en Columna Empacada – Método de Prueba", 2011..

[13] H.M.Womeni, M. Linder, B. Tiencheu, F.T Mbiapo, P.Villeneuve, Fanni, J. and M. Parmentier, "Oils of insects and larvae consumed in Africa: potential sources of polyunsaturated fatty acids". *Oléagineux, Corps Gras, Lipide*s, vol.16, no, 4-6, pp. 230-235, 2009.

DESMINERALIZACIÓN EN FLUJO CONTINUO DE LACTOSUERO BOVINO DULCE PROVENIENTE DE LA ELABORACIÓN DE QUESO PANELA EN LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO.

Jiménez-Osuna, G., García-Parra, M.D., y *Prado-Ramírez, R.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019, Zapopan, Jalisco.

*Autor para correspondencia: rprado@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El lactosuero es el líquido obtenido de la elaboración de queso. Alrededor del 18% de los sólidos presentes en el lactosuero son proteínas, las cuales tienen importancia por su actividad antimicrobiana. Para obtener las fracciones de proteínas, se deben aplicar procesos de purificación como microfiltración, desmineralización y ultrafiltración. El objetivo de este trabajo fue efectuar la purificación de lactosuero dulce obtenido en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, mediante la desmineralización en flujo continuo. La caracterización fisicoquímica del lactosuero comprendió el pH, acidez, sólidos totales, cenizas, proteína, humedad y conductividad. Se emplearon membranas de 10, 3 y 0.8µm para microfiltración. Se empleó una resina catiónica fuerte a 4 bed volumes y resina aniónica débil a 5 bed volumes. La microfiltración disminuyó 21.3% los sólidos totales y las cenizas un 17.7%. La desmineralización cambió el pH de 6.38 a 12 y la conductividad disminuyó 23%. Concluyendo, el perfil fisicoquímico del suero es apto para la purificación ya que el porcentaje de proteína (0.81), de %cenizas (0.67) y el pH (6.38) concuerdan con la literatura (0.80, 0.5-0.7 y 6.4, respectivamente). La desmineralización fue eficiente, disminuyó las cenizas en un 75%. Estos resultados permitirán continuar con el fraccionamiento proteico del lactosuero.

Palabras clave: Purificación de lactosuero, desmineralización continua, resinas de intercambio iónico.

INTRODUCCIÓN

En México, la producción de leche es una de las actividades pecuarias más importantes; en el 2016, se produjeron 11 mil 767 millones de litros de leche bovina, poco más de 32 millones de litros por día, donde el estado de Jalisco fue el mayor productor, aportando casi el 20% de la leche producida en el país con 2 mil 157 millones de litros [1]. La leche es uno de los alimentos más completos que existen en la naturaleza, además de ser la materia principal de la cual derivan otros, como el queso. En 2010, México se ubicó en noveno lugar a nivel global con una producción de queso ofertada de 244,000 toneladas [2], produciendo a la par aproximadamente 2'196,000 toneladas de lactosuero (considerando que para producir un kilo de queso, se necesitan 10 de leche). El lactosuero es un líquido verde-amarillento proveniente de la producción de queso y se puede clasificar en lactosuero dulce (pH 6.5) y lactosuero ácido (pH 4.5) [3]. Contiene alrededor del 55% de los sólidos totales de la leche, de este porcentaje del 18-20% son proteínas [4]. Debido a su contenido nutrimental, a nivel nacional el lactosuero se ha utilizado en la industria para diversos fines, ya sea como ingrediente en productos de panificación, de confitería, postres, etc., o como producto base para la elaboración de fórmulas lácteas

infantiles, alimento para ganado, concentrados proteicos y alimentos nutraceúticos empleados como suplemento de la dieta de los deportistas [3], [5]. Sin embargo en los últimos años, las proteínas del suero de leche han tomado importancia debido a que poseen diversas actividades biológicas, como antihipertensiva, anticancerígena, antioxidante, inmunomoduladora y, antimicrobiana, ya que su actividad es de amplio espectro al ser efectiva contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, virus y hongos [3], [6–8]. La caracterización fisicoquímica es importante, dado que la concentración de proteínas en el lactosuero depende de varios factores como la alimentación del ganado, el tipo de queso elaborado, etc. A partir de esta caracterización es factible definir el tipo de pretratamiento que debe darse antes de la desmineralización y de la ultrafiltración. La caracterización, pretratamiento y desmineralización son partes fundamentales para el fraccionamiento de las proteínas del suero de leche, y el objetivo de este trabajo fue realizar la desmineralización de lactosuero bovino dulce proveniente del proceso de elaboración de queso panela en la zona metropolitana de Guadalajara utilizando columnas de intercambio iónico con resinas de intercambio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El lactosuero se obtuvo de la fabricación de queso panela proveniente de una quesería local. Se conservó a 4 ºC. El experimento se llevó a cabo a nivel laboratorio en las instalaciones del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco S.A. de C.V. (CIATEJ), se utilizaron dos lotes de suero de leche bovino dulce con un volumen de 2-3 litros cada uno.

Caracterización fisicoquímica y microbiológica

Los parámetros considerados para caracterizar fisicoquímicamente el lactosuero fueron los siguientes: pH, acidez titulable, humedad, sólidos totales, cenizas y conductividad. La caracterización se realizó por triplicado para cada parámetro y por cada lote. Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro Thermo Scientific. Para la determinación de acidez titulable, humedad, sólidos totales y cenizas se siguió la metodología descrita en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y en las Normas Mexicanas (NMX): NOM-155-SCFI-2012 (acidez titulable), NMX-F-083-1986 (humedad y sólidos totales) y NMX-F-066-S-1978 (cenizas). Para la conductividad se utilizó un conductímetro Hach sension 5.

La caracterización microbiológica se realizó en cuenta en placa de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Coliformes Totales (CT), Hongos y Levaduras (H/L) y Bacterias Ácido Lácticas (BAL). Las determinaciones de microorganismos indicadores se realizaron por duplicado para cada lote. Para la cuenta en placa de BMA, CT y H/L se tomaron 10 mL de lactosuero y se homogenizaron en 90 mL de agua peptonada al 1%. Posteriormente, se realizaron las diluciones tomando 150 µL e inoculándolos en 1350 µL de agua peptonada al 1%. Para BMA las diluciones se realizaron hasta 10^5, CT 10^4 y H/L 10^3. Finalmente se tomó 1 mL de cada dilución y se depositó en placas 3M™ Petrifilm™ (Fig. 14). En el caso de las BAL, la siembra se realizó en superficie en placas con agar MRS (Man, Rogosa Y Sharp), siguiendo el procedimiento previamente descrito, discordando en la última parte, ya que sólo se tomaron 100 μl de cada dilución para colocarse en las cajas Petri donde la muestra se distribuyó en la superficie utilizando un asa de Drigalski. Para BAL se realizaron diluciones hasta 10^4.

Las condiciones de incubación para BMA, CT, H/L y BAL fueron 32 ºC por 24 hrs, 37 ºC durante 48 hrs, 25 ºC por 5 días, 32 ºC de 24-48 hrs, respectivamente.

Pretratamiento

Para la microfiltración se utilizó un equipo de microfiltración Merck Millipore, círculos de papel filtro de celulosa de 142 mm de diámetro y tamaño de poro de 10 y 3 μm (HPF103484, Prof. en Equipo y Filtración, S.A. de C.V.), y membranas de nitrocelulosa de 0.8 μm (RAWP14250, Merck Millipore) con el mismo tamaño de diámetro. Las condiciones para el proceso fueron presión positiva de 2 kg/m^3 (sólo en el caso de las membranas de nitrocelulosa fue necesaria esa cantidad) y una temperatura de 25 ºC, antes y después de ser filtradas las muestras se mantuvieron en hielo para mantener la cadena de frío. Al finalizar la microfiltración se agregó Citrogen M (conservador natural de grado alimenticio) a una proporción de 100 μL de conservador por cada 500 mL de muestra y se almacenó a 4 ºC.

Desmineralización en flujo continuo

Para la desmineralización se utilizaron 2 lotes. El volumen del Lote 1 fueron 2 L de suero con conservador, y para el Lote 2, su volumen de 2 L se separó en 1 L de suero con conservador (SCC) y 1 L de suero sin conservador (SSC). Este proceso se realizó en flujo continuo en columnas, donde se emplearon resinas de intercambio iónico. Primero se utilizó una resina catiónica fuerte Purolite® C160 a un flujo de 4 *bed volumes* (17 mL/min) y posteriormente, una resina aniónica débil (Lewattit® S 4268) a un flujo de 5 *bed volumes* (21mL/min), ambas fueron usadas hasta su saturación. El suero durante la desmineralización se mantuvo a 10 ºC, al finalizar, se almacenó a 4 ºC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica y microbiológica

Las características fisicoquímicas y microbiológicas generales son representadas en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Características fisicoquímicas del lactosuero.

Parámetro	Media	ES$\bar{x}$
Acidez (%)	0.165	$\pm$ 0.005
pH	6.38	± 0.015
Humedad (%)	93.26	± 0.084
ST (%)	6.73	± 0.08
Cenizas (%)	0.67	± 0.07
Conductividad (ms/cm)	8.21	± 1.07
Proteína (%)	0.81	± 0.06
Color	Amarillo-verdoso	

Tabla 2. Características microbiológicas del lactosuero.

M.O.	Log_{10} UFC/mL	ES$\bar{x}$
Bacterias Mesófilas Aerobias	5.10	$\pm$ 4.74
Coliformes Totales	4.35	± 4.02
H/L	2.22	± 1.51
Bacterias Ácido Lácticas	5.45	± 5.21

El porcentaje de acidez encontrado fue de 0.165, muy cercano al reportado por otros autores [9], [10]. El valor promedio de pH fue de 6.38, el cual se encuentra dentro del rango cercano a 6.5 carcaterístico del suero bovino dulce [3].Asimismo, un valor de pH de 6.42 fue encontrado en lactosuero bovino dulce proveniente de elaboración de queso panela [11].

Se obtuvo un promedio de humedad de 93.26%, cercano a los reportado por varios autores para lactosuero bovino dulce [10], [13], [14].

Para sólidos totales el promedio fue de 6.73%; este se presenta dentro del rango especificado por otros autores [15], [16]. Algunos autores determinaron que este parámetro se encuentra entre valores de entre 5-7% [17]; mientras que otros reportaron un valor mayor [13]. Sin embargo, el valor de 6.788% de lactosuero proveniente de queso panela es el que más coincide [11].

Los valores reportados para cenizas han sido considerados entre un rango de 5-7%, dentro del cual se encuentra el resultado de este experimento [18]; El promedio de cenizas de 0.67, con cuerda con lo señalado por algunos autores [9], [13], [19]. En contraste, se han mencionado valores menores (0.399) también para lactosuero bovino dulce [11].

La conductividad promedio fue de 8.21 ms/cm, contrastándose con promedios menores como 5.18 ms/cm y valores hasta tres veces mayores como 27.7 ms/cm [10], [13], [20]. La conductividad eléctrica del lactosuero difiere debido a que este parámetro depende de la proporción de sales solubles y sólidos disueltos. La lactosa no aporta a la conductividad, pero la grasa la disminuye [13], [20].

Algunos autores aluden que la proteína en el suero constituye uno de los elementos más representativos junto con las sales minerales; así también como uno de los elementos con mayor potencialidad para su obtención y posterior uso industrial. La fluctuación del contenido de proteína reportado fue de 0.25-0.85% [21]. Otros autores al haber caracterizado distintos tipos de quesos mexicanos, reportaron un promedio de proteína muy bajo de 0.26% [11]; no obstante, se han reportado valores de 1.26% y 0.83% en quesos tipo panela y Oaxaca en México [13]. Asimismo, se reportó un valor máximo de 0.8%, especialmente cuando se trata de albúminas y globulinas y compuestos derivados del desdoblamiento de la caseína [17]. El promedio encontrado en esta caracterización, se encuentra dentro del intervalo establecido, ya que su valor es de 0.81%.

El color apreciado en el lactosuero fue amarillo-verdoso, concordando con lo mencionado por varios autores [3], [13], [22], [23].

Aunque los resultados obtenidos son parecidos a los que anteriormente se han documentado, la variabilidad de éstos estará siempre presente, ya que la cantidad de los componentes del lactosuero dependen del tratamiento tecnológico que se le dé a la leche para la elaboración del queso y de la calidad composicional de la leche; que a su vez, es dependiente de la raza del animal del que provenga y la alimentación del mismo.

Tabla 3. Especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas del suero de leche líquido pasteurizado (PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012).

Parámetro	Suero líquido dulce	Suero líquido ácido
Acidez expresada como ácido láctico (%)	0,07 a 0,12	> 0,12
Proteínas (%)	0,72 mín.	0,72 mín.
Ph	6,4 a 6,7	< 6,4
Densidad (g/mL)	1,023 a 1,026	1,023 a 1,026
Grasa (%)	0,10 máx.	0,10 máx.
Lactosa (%)	4,7 mín.	4,7 máx.
Cenizas (%)	0,53 mín.	0,53 mín.
Punto Crioscópico °C (°H)	-0,498 (-0,520) a -0,556 (-0,580)	< -0,556 (-0,580)
Inhibidores	Negativo	Negativo
Bacterias mesofílicas aerobias (UFC/mL)	10 000 máx.	10 000 máx.
Organismos coliformes (UFC/mL)	100 máx.	100 máx.

De acuerdo al Proyecto Norma PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012, los valores de pH (6.38), proteína (0.81%), acidez (0.165) y cenizas (0.67%) obtenidos, se encuentran dentro de los límites. En cuanto a los aspectos microbiológicos, los resultados exceden las cantidades especificadas para los distintos grupos de microorganismos; ya que el Proyecto Norma determina 4 Log_{10} UFC/mL para BMA y se obtuvo una cuenta total de 5.1 Log_{10} UFC/mL. Para CT se establece un máximo de 2 Log_{10} UFC/mL, el cual fue excedido por el doble, al obtenerse una cuenta total de 4.35 Log_{10} UFC/mL. Los resultados obtenidos de la caracterización microbiológica solamente se pueden comparar de manera parcial, ya que estas especificaciones son para suero dulce pasteurizado y el experimento se realizó con lactosuero dulce sin tratamiento.

Estos resultados microbiológicos también pueden ser comparados con los reportados reportados utilizando lactosuero de queso Chihuahua, por ejemplo (Tabla 4.) [24].

Tabla 4. Características microbiológicas de suero de queso Chihuahua por región (Montoya *et al.*, 2014).

Parámetro	Región			
	Chuhuahua	Delicias	Camargo	Cuauhtémoc
Coliformes Log10 UFC/ml	5.5 ± 1.4	3.62 ± 1.3	8.11 ± 0.68	5.15 ± 1.21
Mesófilas aerobias Log10 UFC/ml	7.72 ± 1.76	5.68 ± 1.61	9.51 ± 1.02	7.52 ± 0.98
Mohos y Levaduras Log10 UFC/ml	< 1	3.04 ± 0.94	< 1	< 1

El resultado de 5.10 Log_{10} UFC/mL para BMA coincide con el suero de leche proveniente de la región de Delicias con 5.68, ya que todas las demás regiones se encuentran por encima. Aunque existe una diferencia de .58, no se considera significativa, ya que microbiológicamente se considera que hay diferencia cuando el resultado difieren en cantidad de un logaritmo. Para el caso de CT el valor de 4.35 Log_{10} UFC/mL se encuentra en medio de los reportados en las regiones de Chihuahua, Cuauhtémoc y Delicias (5.5, 5.15, 3.62 Log_{10} UFC/mL, respectivamente) y por debajo del reportado en la región de

Camargo de 8.11 Log_{10} UFC/mL. El valor obtenido para H/L DE 2.22 Log_{10} UFC/mL se encuentra por encima de lo reportado en las regiones de Chihuahua, Camargo y Cuauhtémoc (<1) y por debajo de lo reportado en la región de Delicias (3.04). Los resultados siempre serán diferentes al compararse entre lugares e incluso entre lotes del mismo lugar, ya que éstos valores dependerán de cómo se realicen las prácticas de manufactura y cómo se haya manipulado la materia prima y los utensilios previamente a su procesamiento.

Pretratamiento

El resultado de la microfiltración fue una reducción de sólidos totales en un 21.3%, pasando de un promedio de 6.73% a 4.89% y de cenizas del 17.27%, disminuyendo la media de 0.66% de cenizas a 0.54%; por consiguiente, hubo aumento de la humedad en un 2.09%, al pasar de 93.26% a 95.10%. Además, fue perceptible un cambio de color, esto causado por la eliminación paulatina de sólidos en las distintas etapas.

Desmineralización

A lo largo del proceso de desmineralización se presentaron variaciones de pH y conductividad en ambos Lotes. En general, el pH promedio de 6.38 disminuyó a alrededor de 1.65 después de la primera resina, y aumentó a 12 después de la segunda [11].

A continuación, se muestran las figuras con los cambios de pH y conductividad de los Lotes 1 y 2.

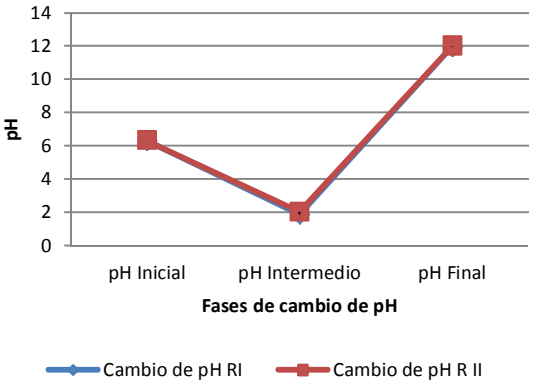


Figura 1. Cambio de pH Lote 1.

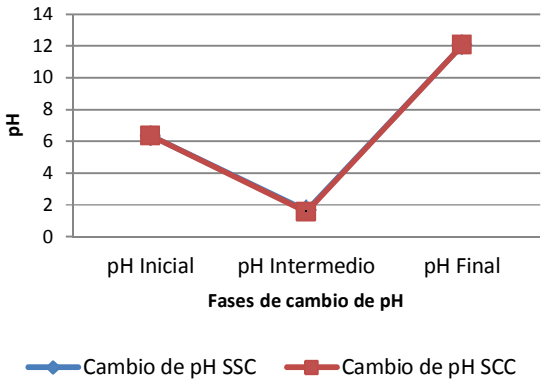


Figura 2. Cambio de pH Lote 2.

Los cambios de pH en las dos repeticiones del Lote 1 fueron similares. Para la repetición I, los pH fueron 6.3, 1.8 y 11.96; para la repetición II fueron 6.31, 2.02 y 12.02 (el volumen de 2L del Lote 1 se separó en 2 corridas de 1L, dando origen a la repetición I y II) (Figura 1).

En el Lote 2 ambas muestras (con y sin conservador) presentaron variación en el pH de manera homogénea siendo los valores 6.33, 1.65 y 12.04 para el lactosuero sin conservador, y, 6.35, 1.55 y 12.04 para el suero con conservador (Figura 2). Con lo que se hace evidente que el uso de este conservador no influye en los cambios de pH en el proceso de desmineralización

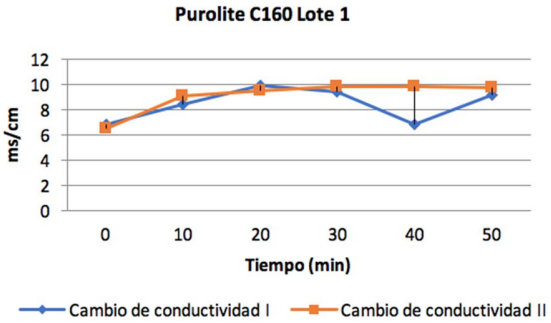


Figura 3. Cambio de conductividad del Lote 1 con la resina Purolite C160.

En la repetición I del Lote 1, en el minuto 10 se muestra un incremento en la conductividad, sin embargo, en el minuto 40 hubo una caída, esto posiblemente debido a que se abrió la columna para remover unas burbujas de aire y no se dio en ese momento un adecuado intercambio iónico. En cambio en la repetición II, incrementó la conductividad y se mantuvo estable (Figura 3). La conductividad inicial para la repetición I fue de 6.87 ms/cm y la final de 9.17 ms/cm; para la repetición II, la conductividad inicial y final fueron 6.51 y 9.73 respectivamente, comportándose ambas repeticiones de manera similar.

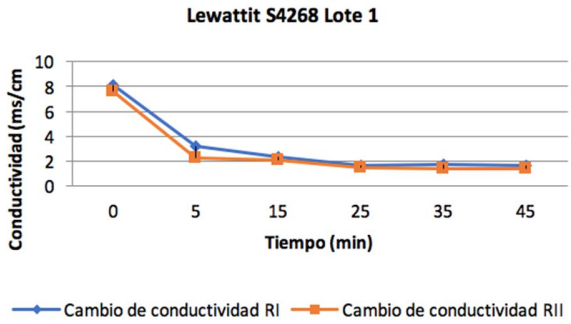


Figura 4. Cambio de conductividad del Lote 3 con la resina Lewattit S4268.

Igualmente hubo un comportamiento similar en el cambio de conductividad de ambas repeticiones del Lote 1 al ocurrir el intercambio iónico con la resina aniónica débil. La conductividad inicial para la repetición I fue de 8.14 y final de 1.68; para la repetición II la conductividad inicial fue de 7.57 y final de 1.42 (Figura 4).

Ambas resinas no presentaron saturación en ningún caso; esto se puede observar en que después de transcurrido el tiempo, se mantuvo estable el valor, no disminuyó (Purolite C160 aumenta la conductividad) o aumentó (Lewattit S4268 disminuye) la conductividad.

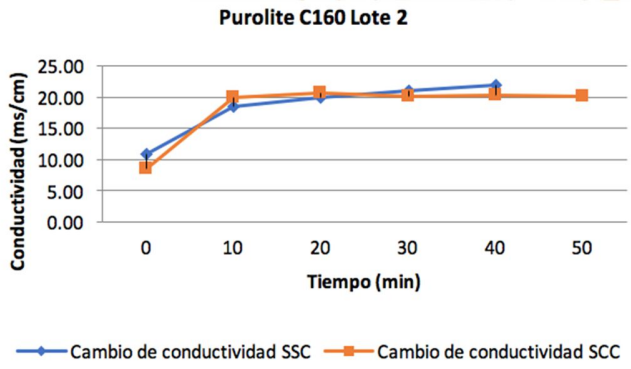


Figura 5. Cambio de conductividad del Lote 4 con la resina Purolite C160.

La conductividad media del Lote 2 fue más alta inicialmente (9.66 ms/cm) comparándola con la conductividad del otro lote, los cuales presentaron un promedio de 6.69 ms/cm. El cambio de conductividad se dio drásticamente en el minuto 10, aumentando para el SSC de 10.84 a 18.47, y de 8.49 a 19.97 ms/cm (Figura 5).

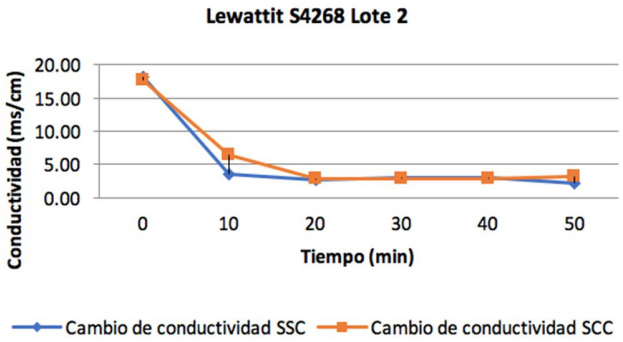


Figura 6. Cambio de conductividad del Lote 4 con la resina Lewattit S4268.

Igualmente que en la resina catiónica fuerte utilizada para SSC y SCC, el cambio fue drástico. La conductividad del SSC disminuyó de 18.22 a 3.55 ms/cm en el minuto 10, y de 17.70 a 6.35 ms/cm la del SCC, en el mismo tiempo (Figura 6), alcanzando una conductividad final de 2.10 para SCC y 2.11 ms/cm para SSC. El cambio de conductividad en ambos Lotes ocurrió de manera similar aunque la conductividad del segundo fue mayor, disminuyendo la conductividad inicial en un 23 (Lote 1) y 22% (Lote 2). La variación de la conductividad está directamente relacionada con la carga que presenten las proteínas a los diferentes pHs a los que son sometidas y de manera indirecta a la concentración de estas en el lactosuero [25]. A pHs próximos al punto isoeléctrico (pI), las moléculas proteicas manifiestan un mínimo de interacciones con el agua, formando agregados insolubles que intervienen en la disminución de la conductividad [26][27]. Correlacionando los dos parámetros (pH y conductividad), al disminuir el pH aumenta la conductividad y viceversa; fenómeno que también se menciona en otro estudio de conductividad de leche [25].

El lactosuero cambió de color amarillo-verdoso a blanco-amarillo al finalizar la desmineralización. Esto ocurre debido a la disminución de la cantidad de sales disueltas [28]. Lo que puede comprobarse al haber disminuido la cantidad de cenizas en un 75% (Figura 7).



Figura 7. Cambio de color del lactosuero antes y después de la desmineralización.

CONCLUSIONES

El perfil fisicoquímico del lactosuero es apto para el proceso de purificación, ya que valores como el % de proteína (0.81), pH (6.38), % de cenizas (0.67), % de sólidos totales (6.73) y % de grasa (0.65) coinciden con el 0.80, 6.4, 0.5-0.7, 5-7 y 0.62 reportados en la literatura.

El pretratamiento es un proceso en el cual se puede reducir de manera significativa la cantidad de sólidos, en este caso, los sólidos totales se redujeron en un 21.3% al finalizar la microfiltración.

La desmineralización fue eficiente, ya que redujo la cantidad de minerales en un 75% respecto al valor inicial.

La aplicación de este tipo de conservador no interviene en los cambios de pH y conductividad en el proceso de desmineralización.

Los resultados de este trabajo permitirán continuar con los trabajos de fraccionamiento de proteínas de lactosuero.

REFERENCIAS

[1] S. de I. A. y P. (SIAP), "Leche de Bovino. Avance mensual de la producción Pecuaria," 2016.
[2] J. A. C. J. Almanza Gaviña, "El negocio del queso," 20-Jan-2011.
[3] M. Hernández-rojasF and J. F. Vélez-Ruiz, "Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales," *Temas Sel. Ing. Aliment.*, vol. 8, no. 2, pp. 13–22, 2014.
[4] T. Tavares and F. Malcata, "Whey proteins as source of bioactive peptides against hypertension," *Bioact. food Pept. Heal. Dis.*, pp. 75–114, 2013.
[5] E. Poveda E., "Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad," *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 40, no. 4, pp. 397–403, 2013.
[6] H. Jenssen and R. E. W. Hancock, "Antimicrobial properties of lactoferrin," *Biochimie*, vol. 91, no. 1, pp. 19–29, 2009.
[7] K. Marshall, "Therapeutic applications of whey protein.," *Altern. Med. Rev.*, vol. 9, no. 2, pp. 136–

156, 2004.

[8] M. A. Manso and R. López-Fandiño, "K-Casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses," *Food Rev. Int.*, vol. 20, no. 4, pp. 329–355, 2004.

[9] A. M. Rojas, L. P. Montaño, and M. J. Bastidas, "Producción De Ácido Láctico a Partir Del Lactosuero Utilizando Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus Y Streptococcus Thermophilus," *Rev. Colomb. Química*, vol. 44, no. 3, p. 5–10pp., 2016.

[10] S. Antonio, R. Evelyn, and R. Adriana, "Como Bebida Energizante Para," vol. 11, no. 26, pp. 257–268, 2015.

[11] W. J. Guerrero, C. a. Gomez, J. Castro, C. a. González, and E. M. Santos, "Caracterizacion Fisicoquimica del Lactosuero en el Valle de Tulancingo," *XII Congr. Nac. Cienc. y Tecnol. los Aliment.*, pp. 321–328, 2010.

[12] R. Catellanos, R. R, and G. Frazer, "Efectos fisiológicos de las bebidas energizantes," *Rev. Fac. Cienc. Méd.*, vol. Ene-Jun, pp. 43–9, 2006.

[13] J. Callejas Hernández, G. Prieto, R. Cruz, M. Santillán, and M. Marzo, "Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo," *Acta Univ.*, vol. 22, no. 1, pp. 11–18, 2012.

[14] R. Parra, "Digestión Anaerobia de Lactosuero : Efecto de Altas Cargas Puntuales Anaerobic Digestion of Whey : Effect of High Point Loads," *Rev. Fac. Nac. Agron.*, vol. 63, no. 1, pp. 5385–5394, 2010.

[15] P. S. Panesar, J. F. Kennedy, D. N. Gandhi, and K. Bunko, "Bioutilisation of whey for lactic acid production," *Food Chem.*, vol. 105, no. 1, pp. 1–14, 2007.

[16] R. A. Parra Huertas, "Lactosuero: importancia en la industria de alimentos.," *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, vol. 62, no. 1, pp. 4967–4982, 2009.

[17] E. Spreer, *Lactología Industrial*, Segunda. Acribia Editorial, 1991.

[18] J. G. Zadow, "Lactose Hydrolysis," in *Whey an Lactose Processing*, Elsevier Scince Publishers Ltd, 1992, p. 388.

[19] R. M. Avila, A. Cárdenas, and A. L. Medina, "TRATAMIENTO DEL LACTOSUERO UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELECTRODIÁLISIS Introducción," vol. 25, no. 2, 2000.

[20] G. Mucchetti, M. Gatti, and E. Neviani, "Electrical conductivity changes in milk caused by acidification: Determining factors," *J. Dairy Sci.*, vol. 77, no. 4, pp. 940–944, 1994.

[21] C. A. Viteri, "Caracterización fisicoquímica del suero dulce obtenido de la producción de queso casero en el municipio de Pasto .," pp. 22–32, 2014.

[22] S. Baena, C. Campos, and G. Rojas, "Aguas residuales de la industria láctea: naturaleza y composición de las aguas residuales," *Rev. Ambient. y Desarro. Pontif. Univ. Javeriana.*, vol. 2, no. 2 y 3, pp. 83–93, 1994.

[23] S. S. MARWAHA and J. F. KENNEDY, "Whey—pollution problem and potential utilization," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 23, no. 4, pp. 323–336, 1988.

[24] P. Montoya *et al.*, "Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua," *Investig. Cienc.*, vol. 22, no. 62, pp. 11–16, 2014.

[25] D. Díaz lezama, "LA LECHE (CASEÍNA Y DEL LACTOSUERO) FRENTE AL TRATAMIENTO TÉRMICO Y pH LA LECHE (CASEÍNA Y DEL LACTOSUERO) FRENTE AL TRATAMIENTO TÉRMICO Y pH," Lima, Perú, 2010.

[26] J.-C. Cheftel, J.-L. Cuq, and D. Lorient, *Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones químicas*. Acribia Editorial, 1989.

[27] S. Damodaran, "Aminoacids, Peptides and Proteins," in *Food Chemistry*, Third., O. R. Fennema, Ed. New York, New York: Marcel Decker Inc., 1996, pp. 321–431.

[28] B. Cuartas, "Estudio del proceso de nanofiltración para la desmineralización de lactosuero dulce," 2005.

[29] O. N. de N. del COFOCALEC, *Proyecto de norma mexicana PROY-NMX-F-721-COFOCALEC*. México, 2012, pp. 1–12.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE NUEZ PECANA DE VARIEDADES CULTIVADAS EN EL ESTADO DE CHIHUAHUA.

[1]Carreón-Betancourt, K., [3]Ponce-Hernández, S., [3]Obregón-Solís, E., [3]García-Fajardo, J.A., [2]Esquivel-Hernández, D.A. y [3]Reyes-Vázquez, N.

1. Universidad Tecnológica Cadereyta.
2. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, campus Monterrey.
3. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad Noreste.

*Autor para correspondencia: nreyes@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

Entre las principales variedades comerciales de nuez pecanera cultivadas en México se encuentran Western 50 %, Wichita 33 % y variedades criollas con 17 % [1], siendo el estado de Chihuahua el principal productor. Actualmente existe interés de darle un valor agregado diferente a la elaboración en dulces o panificación. Una opción, aún incipiente, es la obtención de aceites. Por lo que es necesario implementar métodos de extracción y conocer la composición fisicoquímica y perfil de ácidos grasos de las variedades cultivadas en diferentes localidades. En este trabajo se evaluó Western-Wichita de Jiménez (WJ), San Ignacio (WI), San Julián (WJul) y Trinidad (WT) además de Criolla (C). Una vez descarada, en la almendra se determinó calidad nutritiva (Humedad, proteína, cenizas, grasa y ELN) de acuerdo a AOAC, 2012. El aceite fue extraído con hexano mediante soxhlet, determinando los rendimientos y su calidad fisicoquímica (densidad, índice de refracción, acidez y peróxidos y color). Mediante CG-Detector de Masas se determinó el perfil de ácidos grasos mayoritarios mediante los porcentajes de áreas de los compuestos identificados. Los resultados indicaron para las diferentes variedades una composición nutritiva similar para humedad y cenizas de 2.8 y 1.40 % respectivamente, presentado diferencias en extracto etéreo, siendo mayor en la (C) con 72% y menor en (WJul) con 65 %. La (WT) exhibió la cantidad mayor de proteína con 10 %. Los rendimientos de extracción de aceite fueron mayores para WJ con 77% y menores para (WI) con 70%, sin diferencia significativa. La densidad (0.91 g/cm3) e indice de refracción (1.47) fueron similares entre variedades, mientras la acidez varió entre 2.62 a 4.05 % sin diferencia significativa. El índice de peróxidos fue significativamente mayor para (WT) y (C) con 16.70 y 11.50 meq/Kg respectivamente. Todos los aceites analizados presentaron ácidos grasos altamente in saturados (88%). En (C) y (WJ) el perfil presentado varió siendo: 66, 21 y 1 % y 56, 31 y 1%para la primera y segunda en oleico, linoleico y linolénico respectivamente. La proporción de oleico y linoleico fue distinto a los reportados por Costa-Singh y Jorge [2], para nuez cultivada en Brasil. Por lo que, el aceite de nuez pecanera de variedades comerciales cultivadas en diferentes localidades de México es una buena fuente de ácidos grasos con aplicación potencial hacia alimentos o farmacia.

Palabras clave: Carya Illinoinensis; nuez pecanera; aceite nuez pecanera; soxhlet; cromatografía.

REFERENCIAS

[1] Orona Castillo, I., Sangerman-Joaquín, Fortis-Hernández, M. y Vázquez Vázquez, C. (2013). Production and marketin of pecan nuts (Carya illinoensis Koch) in northern Coahuila, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 14 (3):461-476.

[2] Costa-Singn, T. and Jorge, N. (2015). (2015). Characterization of Carya Illinoiensis and Junglans regia oils obtained by different extraction systems. Acta Scientiarum Technology. 37(2):279-285.

EFECTO DEL TIPO DE TOSTADO DE CAFÉ SOBRE EL AGRADO Y PREFERENCIA EN CONSUMIDORES UNIVERSITARIOS.

[1]Ruiz-Palomino, P., [2]Virgen-Navarro, L., [1]Guatemala-Morales, G.M., [1]Hernández-Prudencio, E.J., [1]Rodríguez-Paredes, E. y [1]Beltrán-Medina, E.A.

1. Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Av. Normalistas No. 800 C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México.
2. Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. General Ramón Corona. No. 5214, C.P. 45138, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: es_ebeltran@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La calidad del café como bebida está estrictamente relacionada con el sabor y aroma desarrollados durante el proceso de tostado, el cual depende -entre otros factores- del grado de tueste que es función de las temperaturas y tiempos de tostado empleados [1]. En el presente trabajo se realizó un estudio de agrado y preferencia entre tres marcas comerciales de café con tueste medio y una infusión preparada a partir granos de café procesados en un tostador de lecho fuente. El sistema anterior posee un diseño innovador y es simple de construir, operar y controlar; presenta baja caída de presión y, principalmente, es de fácil limpieza [2]. El grado de tueste denominado como medio fue fijado con las muestras comerciales a partir de parámetros del espacio de color CIE 1976 L*a*b* por medio de un colorímetro MiniScan® EZ (iluminante D65 y el observador patrón a 10°) [3]. Una vez definido, se buscaron las condiciones de tiempo y temperatura que dieran los parámetros fijados (300°C de temperatura del aire y 37 minutos). Para la preparación de la infusión se empleó una relación de 7.0 ± 0.1g de café por cada 100 ml de agua la cual fue reservada en recipientes térmicos hasta el momento de la degustación. Los participantes olieron y probaron aproximadamente 25 mL de cada muestra enjuagándose la boca con agua al cambiar de una a otra. Cada entrevistado llenó un formato de encuesta en el que calificaban el sabor y olor de cada muestra mediante una escala hedónica de siete puntos. Asimismo, se les pedía a los participantes que eligieran la muestra que preferían. Para el análisis estadístico se hizo una prueba ANOVA ($\alpha = 0.05$) donde los factores fueron el tipo de tostado (3 comerciales y el tostado no convencional) y el sexo. Como variables de respuesta se consideraron los atributos de olor y sabor, así como la preferencia. Se observó que, a pesar de los porcentajes de preferencia, las pruebas estadísticas muestran que únicamente en la comparación Jalisco-Comercial 2, hubo diferencias significativas en el sabor para ambos sexos y de olor para el sexo masculino. En el caso de los pares Jalisco-Comercial 1 y Jalisco-Comercial 3, únicamente existieron diferencias estadísticamente significativas para el olor en alguno de los sexos. Se encontró que la calidad sensorial del café tostado en lecho fuente fue similar a dos de las tres muestras comerciales evaluadas.

Palabras clave: café bebida; tipo de tostado; evaluación sensorial; preferencia.

REFERENCIAS

[1] M. R. Ruosi, C. Cordero, C. Cagliero, P. Rubiolo, C. Bicchi, B. Sgorbini, and E. Liberto, "A further tool to monitor the coffee roasting process: aroma composition and chemical indices.," J. Agric. Food Chem., vol. 60, no. 45, pp. 11283–91, Nov. 2012.

[2] G. M. Guatemala-Morales, "Tostado de café (Coffea arábica) utilizando un sistema de lechos fuente en multietapa," Universidad de Guadalajara, 2007.

[3] L. Virgen-Navarro, E. J. Herrera-López, R. Corona-González, E. Arriola-Guevara, and G. M. Guatemala-Morales, "Neuro-fuzzy model based on digital images for the monitoring of coffee bean color during roasting in a spouted bed," Expert Syst. Appl., vol. 54, pp. 162–169, 2016.

EXTRACCIÓN DE SESAMOL APARTIR DE RESIDUO DE AJONJOLÍ (*Sesamum indicum L.)* PROVENIENTE DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ACEITE REFINADO.

Suástegui-Vargas, G., Barrera-Chávez V.A., Padilla-de-la-Rosa, J.D., Villanueva-Rodríguez, S., y Guizar-González, C.

Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Camino Arenero 1227, Zapopan, Jalisco, C.P. 45019, MÉXICO.

*Autor para correspondencia: jdpadilla@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La industria de obtención de aceites a partir de ajonjolí genera diferentes residuos para los diferentes tipos de aceite. Uno de estos es el aceite refinado de ajonjolí obtenido por el prensado de esta semilla de ajonjolí a altas temperaturas y cuyo residuo hasta hoy no tiene una aplicación relevante. La torta de ajonjolí obtenida del proceso de aceite refinado de ajonjolí es el segundo residuo mayoritario y que representa alrededor del 50% de la semilla usada en el proceso, el cual aún conserva propiedades gran importancia clínica. Durante la etapa de refinación del aceite ocurre la transformación de la **sesamina** en **sesamo**l y **sesaminol**, la cual tiene como consecuencia una separación y aumento de contenido tanto para el aceite como la torta de residuo. Este estudio tuvo como principal objetivo caracterizar el residuo de la torta de ajonjolí en cuanto a su potencial bio-funcional para el desarrollo de nuevos productos para la industria farmacéutica o alimentaria. Con este fin, se realizaron pruebas de extracción alcohólica por método de sonicación a temperatura controlada con ultrasonido; para determinar su capacidad antioxidantes por el método de ABTS y su contenido de lignanos mediante el método de Chang, así como también se cuantificó por medio de cromatografía de líquidos (HPLC) el contenido de sesamol presente en el residuo de ajonjolí.

Palabras clave: Lignanos; Torta de Ajonjolí; Sesamol.

INTRODUCCIÓN

El ajonjolí es una planta cuya especie botánica es de la familia *Sesamum indicum*, su cultivo es anual, dependiendo de la variedad y las condiciones ecológicas [1]. Los lignanos son un tipo de compuestos vegetales conocidos como polifenoles. Los precursores de los lignanos son más abundantes en las semillas de lino, aunque también se encuentran en otras semillas (como las semillas de sésamo/ajonjolí), bayas, frutas, vegetales y granos enteros., estos son producidos en reacciones metabólicas secundarias durante el proceso de refinado del aceite, los lignanos contienen propiedades anti-colesterolémicas, anti-hipertensivas y anti-cancerígenas[2]. La venta de estos metabolitos de manera pura tiene un alto costo en el mercado. Hoy en día es de suma importancia contar con alternativas más económicas para obtener precursores de productos de la manera más natural posible. Además los lignanos son un grupo de compuestos naturales que están definidos como un producto de acomplamiento oxidativo del β-hidroxifenilpropano y ampliamente distribuido como un componente menor en el reino de las plantas. Tienen en su estructura química un número variable de grupos

hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante [3].

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de la muestra

Los subproductos de ajonjolí sin cáscara, con cáscara y tostado, proporcionado por SESAJAL, industria líder de extracción de aceite de ajonjolí, fueron procesado en la planta piloto de CIATEJ de acuerdo al diagrama mostrado en la **Figura 1.** Este procesamiento consistió en cuatro etapas. Las tortas de ajonjolí se llevaron a un proceso de molienda en un molino de martillo marca Pulvex para su posterior tamizado mediante un equipo Ro-Tap (mallas 30, 40, 50, y 80) esto con el fin de fraccionar las harinas en base al tamaño de partícula y a partir de estas fracciones estudiar si existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al contenido de flavonoides presentes en cada uno de los residuos.



Ilustración 1. Diagrama de procesamiento de la muestra.

Flavonoides Totales Método de Chang

A una alícuota de 100 µL del sobrenadante del extracto etanólico preparado anteriormente y realizando diluciones para cada materia prima (1:2, 1:4 y 1:10), se añadieron 5 µL de una solución de $AlCl_3$ (tricloruro de aluminio), 5 µL de solución 1 M de CH_3COOK (acetato de potasio) y 140 µL de agua destilada; esta solución fue incubada durante 30 minutos. Su absorbancia se leyó en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO, a una longitud de onda de 415 nm [4].

Determinación De Fenoles Totales Por Método De Folin-Ciocalteu

Para el experimento se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo plano, cada muestra por triplicado, se añadieron 50 µL de muestra, posteriormente se adicionó 75 µL de reactivo de Folin, y finalmente después de 6 minutos se añadieron 30 µL de Na_2CO_3 al 20% y se dejó incubando cada placa durante 60 minutos de igual manera para las concentraciones de la curva de calibración de ácido gálico. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO a 765 nm y se realizó el análisis de los resultados [5].

Método ABTS Determinación De La Capacidad Antioxidante

Para generar el radical catión de ABTS se pesaron 96 mg de reactivo ABTS y se adicionaron 25 mL de etanol para obtener una concentración de 7 mM. Posteriormente se pesaron 16.56 mg de persulfato de potasio (2.45 mM) y se hicieron reaccionar con la solución de ABTS. Se homogenizó y se cubrió con papel aluminio y fue incubada a temperatura ambiente con agitación entre 12 y 16 horas previas a su uso. Después de transcurrido este tiempo, la solución se separó dejando una solución madre y una solución de trabajo para ser ajustada con etanol absoluto hasta conseguir una absorbancia de 0.7

(±0.02) a una longitud de onda de 732 nm en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO. Adicionando 20 µL de muestra (harina sin tamizar, harina inicial, malla 30, 40, 50, y 80 de cada una de las materias primas) del tiempo final con etanol y adicionando 200 µL de solución de ABTS preparada, determinando así su absorbancia [6].

Cromatografía De Líquidos De Alta Resolución (HPLC)

Las muestras se preparon en viales de 2 mL utilizando microfiltros 45 µL para llenar las muestras con 1 mL de los extractos obtenidos por sonicación en etanol-H_2O 70:30, el análisis se llevó a cabo utilizando un HPLC Waters Alliance System® con una columna Varian Microsorb-MV™ 100-5 C18 150x4.6 mm. La fase utilizada fue metanol-H_2O en una concentración de 70:30 acidificando al 0.05% con ácido acético. Se realizaron corridas de 20 min. Dando un total de 61 muestras analizadas [7].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales fue determinado por método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Después de una hora de en la oscuridad se leyó la absorbancia a 760 nm. La gráfica presenta el promedio de las absorbancias de los análisis realizados por triplicado de los tiempos finales de cada extracción de las tres materias primas. Las tres harinas presentaron un contenido moderado alto de fenoles totales.

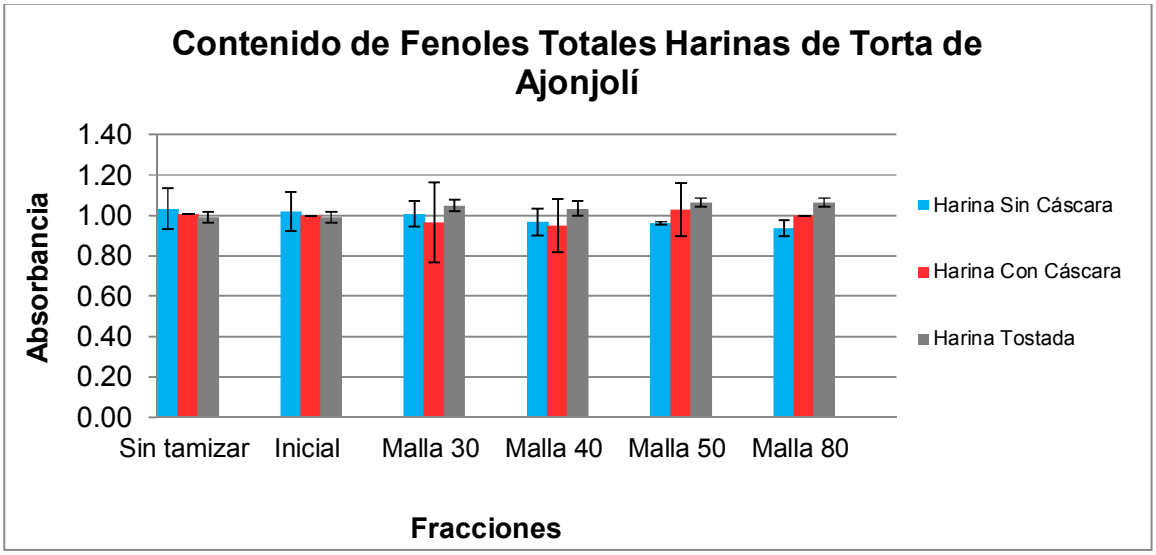


Figura 2. Contenido De Fenoles Totales Harinas De Torta De Ajonjolí, Se Muestra Una Comparativa De Las Absorbancias Obtenidas En Cada Una De Las Harinas Y Fracciones Evaluadas.

Cuantificaciones de Flavonoides

Este experimento demostró la cantidad de flavonoides liberados durante las extracciones realizadas a las fracciones en el tiempo final (60 minutos) de las tres harinas de torta de ajonjolí (sin cáscara, con cáscara y tostada). La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 415 nm). Para establecer el contenido de flavonoides**,** fue realizada una determinación por medio del método de Chang, se puede observar la diferencia del contenido del perfil de flavonoides de las tres harinas como se muestra en la **figura 3**, destacando la harina tostada la cual tiene un contenido de flavonoides superior en comparación de las otras dos tortas de ajonjolí.

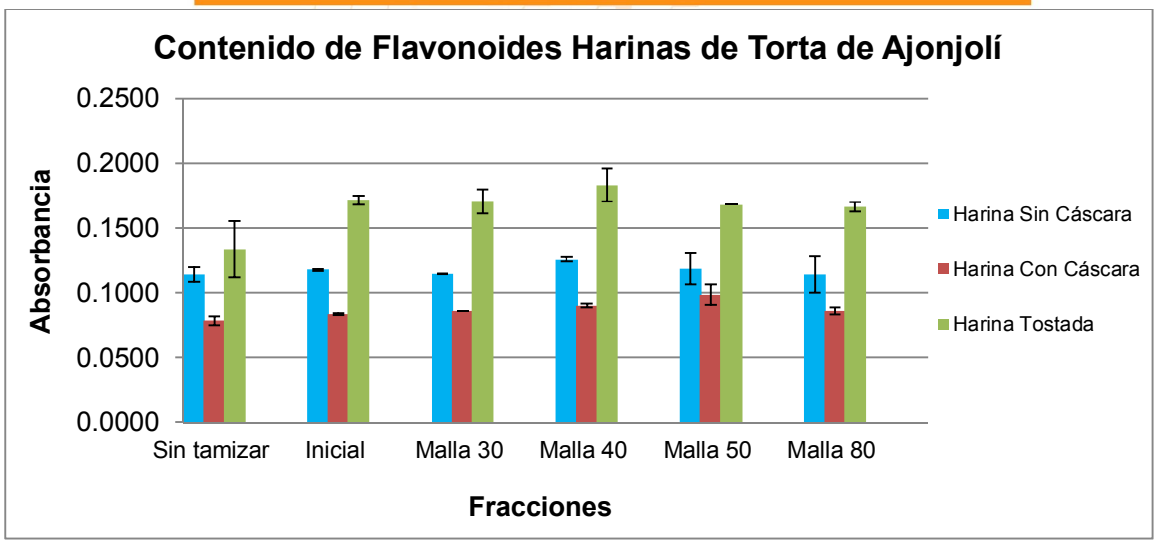


Figura 3. Contenido De Flavonoides Harinas De Torta De Ajonjolí, Se Muestra Una Comparativa De Las Absorbancias Obtenidas En Cada Una De Las Harinas Y Fracciones Evaluadas.

Determinación de la Capacidad Antioxidante

En esta prueba se comprobó la actividad antioxidante de las tres harinas de torta de ajonjolí mediante la capacidad captadora del radical ABTS. Los resultados fueron convertidos a porcentajes de inhibición y expresados en equivalentes de Trolox, para ello se utilizó una curva de calibración de Trolox con una correlación de 0.999**,** se observó en la **figura 4** que los compuestos fenólicos conservan su actividad antioxidante y lo cual da indicios de no ser afectada por el tratamiento térmico durante el prensado de la semilla de ajonjolí y siendo esta una de las propiedades de mayor interés por su efecto en reducir la oxidación de la células.

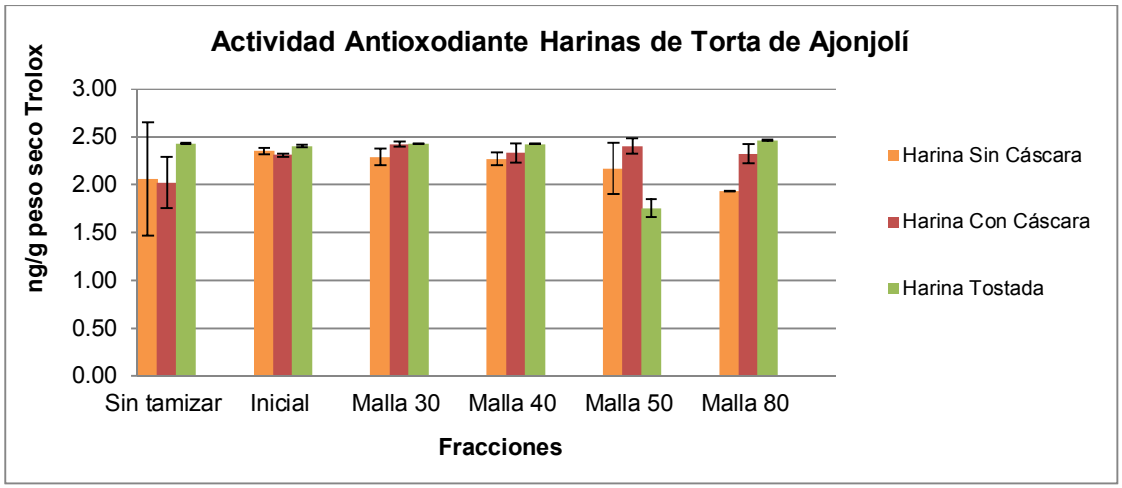


Figura 4. Comparación de la Actividad Antioxidante de las tres Harinas de Ajonjolí, en mg/gps de Trolox.

Cromatografía de Líquidos De Alta Resolución (HPLC)

Para comprobar la hipótesis de la transformación de sesamina-sesamol y verificar los contenidos de este compuesto (sesamol) en las harinas de torta de ajonjolí (sin cáscara, con cáscara y tostado), se realizó un análisis por método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se obtuvieron los siguientes resultados observando un contenido mucho mayor en la torta de ajonjolí tostada en comparación con las otras dos harinas (sin cáscara y con cáscara.)

Así como también se realizó un análisis de varianza con un 95% de confianza para comprobar si este contenido era afectado por el tipo de harina o por el efecto del tamaño de partícula durante el tamizado. En la **figura 6**, la gráfica de medias se muestra claramente que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido de sesamol entre las tres harinas. Mostrando que la harina de torta de ajonjolí tostada muestra el mayor contenido con un contenido promedio de 21.33 mg/100g de peso seco, el cual es mayor en un 82% con respecto a la harina con cascara y un 133% con respecto a la harina sin cascara. En el caso de la harina con cascara muestra un contenido mayor que la harina sin cáscara lo cual es lógico debido a que los lignanos se encuentran mayormente en la cáscara del ajonjolí. Por otra parte a las fracciones tamizadas de cada harina aunque existen diferencias estadísticas significativas entre algunas de las fracciones tamizadas de harinas estas diferencias realmente para efectos prácticos no son importantes, por lo que se puede descartar esta etapa en el proceso de preparación de las muestras para el análisis experimental como se muestra en la **figura 7**.

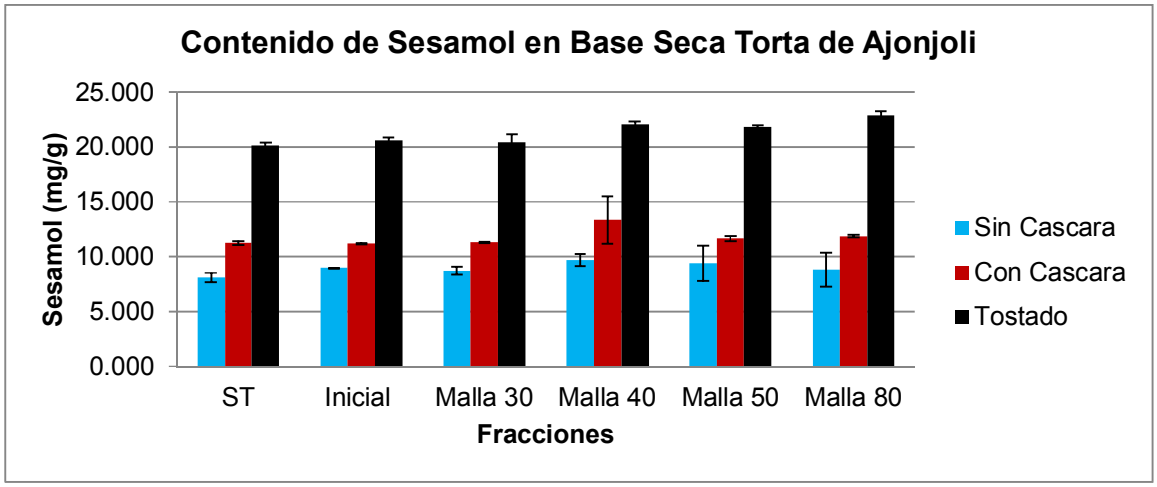


Figura 5. Contenido en Base Seco mg/g de Torta de Ajonjolí Cuantificado por HPLC.

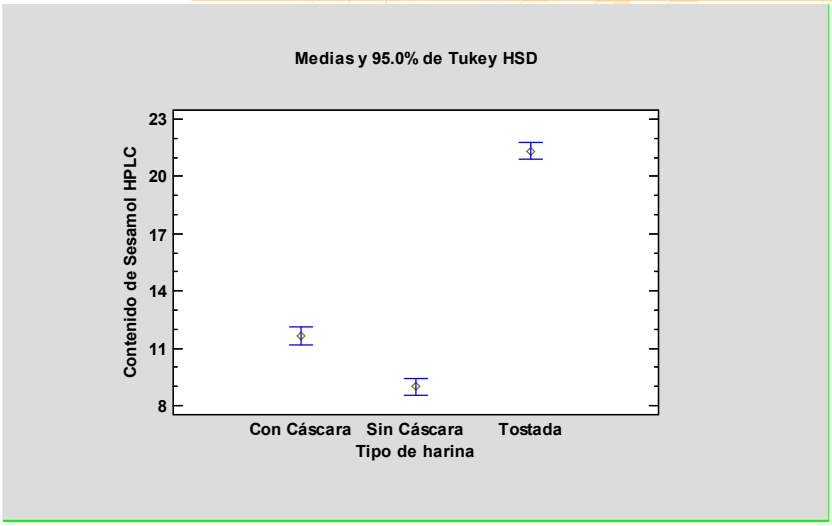


Figura 6. Grafica de Medias De Tuskey Sobre Contenido de Sesamol por HPLC

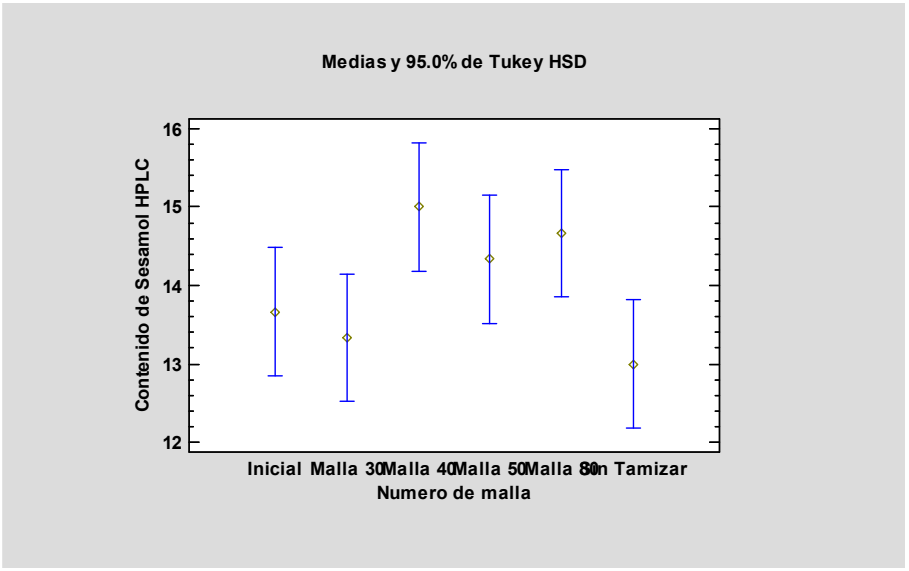


Figura 7. Grafica de Medias de Tuskey Sobre Contenido de Sesamol por Tamaño de Partícula.

CONCLUSIONES

- Se logró caracterizar el contenido de lignanos de tres tipos de torta de ajonjolí, sin cáscara, con cáscara y tostada comparando y confirmando que conservan su contenido después del proceso de prensado en calor e incluso del refinado del aceite.

- De acuerdo a un análisis estadístico realizado:

Si existe diferencia estadísticamente significativa con un 95% de confianza en el contenido de sesamol cuantificado por método de HPLC en función del tipo de harina: sin cáscara, con cáscara y tostada.

Donde el mayor contenido de sesamol se encuentra en la harina tostada con un promedio de 20 mg/g peso seco.

No existe diferencia estadísticamente significativa con un 95% de confianza en el contenido de sesamol cuantificado por método de HPLC por efecto del tamaño de partícula de cada una de las fracciones de harina por lo que el proceso puede simplificarse a una molienda y posterior extracción.

- La harina tostada de ajonjolí como residuo de la industria hasta el día de hoy no tiene una aplicación y en este estudio se demuestra por primera vez en base al conocimiento de los autores que puede funcionar como una fuente de obtención de sesamol.

REFERENCIAS

[1] Cheung SC, Szeto YT, Benzie IF. (2007). Antioxidant protection of edible oils. Plant Foods Hum Nutr. 2007 Mar;62(1):39-42.

[2] Bigoniya, P., Nishad, R., & Singh, C. S. (2012). Preventive effect of sesame seed cake on hyperglycemia and obesity against high fructose-diet induced Type 2 diabetes in rats. *Food Chemistry*, *133*(4), 1355–1361. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.112.

[3] Sarkis, J. R., Michel, I., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. "Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake." Separation and Purification Technology, 122, 506–514. (2014).

[4] Chang C, M. Y. (2002). Estimation Of Total Flavonoids Content In Propolis By Two Complementary Colorimetric Methods. . *J. Food Drug Anal.* , 176-182.

[5] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Meth Enzymol 1999; 299: 152-178.

[6] Sarkis, J. R., Michel, I., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. "Optimization Of Phenolics Extraction From Sesame Seed Cake." Separation And Purification Technology, 122, 506–514. (2014).

EMPLEO DE COAGULANTES VEGETALES DE *Guazuma ulmifolia* LAM (CASCARA Y SEMILLAS) EN LECHE DE VACA.

Montoya-Salazar, D.I., Velasco-Ramírez, S.F.*, Salazar-Camarillo, V.M., Velázquez-Juárez, G., y Ramírez-Anguiano, A.C.

Universidad de Guadalajara; Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías; Departamento de Química; Blvd. Marcelino García Barragán 1421; CP 44430; Guadalajara, Jalisco, México. Tel. (33) 13785900 ext. 27517.

*Autor para correspondencia: sfqfb30@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La exploración de nuevas fuentes de proteasas es un área de investigación de gran importancia por su uso potencial en procesos biotecnológicos en áreas de la medicina y en la industria de los alimentos. En alimentos, las proteasas extraídas de plantas han sido consideradas sustitutos adecuados del cuajo natural para la elaboración de quesos. Además de que el uso de coagulantes alternativos en la fabricación del queso favorece la obtención de productos con diferentes características a los que habitualmente encontramos en el mercado. El presente estudio tiene como objetivo encontrar un sustituto de la coagulación de la leche en distintas partes de Guazuma ulmifolia Lam (Cascara y semillas). Las muestras se maceraron y se utilizaron diferentes tipos de buffers para su extracción. Se encontró que los buffers para para la extracción enzimática más rápida, y eficiente fueron NaCl al 5% y acetato de sodio 0.1M para cascara, y NaCl 5% en tampón de acetato de sodio 0.1M y Acetato de sodio 0.1 M pH 5,0 para semilla. La actividad de coagulación de la leche se observó en las dos partes de Guazuma ulmifolia Lam así que estas fueron utilizadas como fuente sustituta de cuajo para la coagulación de la leche. Las proteínas extraídas se fraccionaron con sulfato de amonio a una concentración de 20, 30,40, 50 60, y 70%. El tiempo de coagulación de la leche con los extractos de cascara y semilla de Guazuma ulmifolia Lam fue de 15 min. Lo que demuestra el potencial del extracto de este vegetal como sustituto de cuajo utilizado en la industria láctea. Sin embargo se necesitan más estudios para purificar y caracterizar completamente este prometedor coagulante vegetal de la leche, contenido en la cascara y semillas de *Guazuma ulmifolia* Lam.

Palabras clave: Coagulantes vegetales; Proteasas; *Guazuma ulmifolia* Lam; Actividad coagulante.

INTRODUCCIÓN

El cuajo y los coagulantes son preparaciones de enzimas proteolíticas, las cuales han sido utilizadas en la industria quesera desde hace años, siendo esta la enzima más antigua conocida. Los quesos son producidos por enzimas coagulantes de la leche de diferentes orígenes.

Además de las enzimas de origen animal y microbiano, las plantas también producen proteasas que pueden coagular la leche y que se encuentran en distintos lugares como frutos, semillas, raíz o savia, pero principalmente se localizan en las hojas y flores. Distintas proteasas (papaína, fidina y bromelina)

han sido extraídas de las plantas superiores *Carica papaya*, *Ficus glabra* y *Ananas comosus*, respectivamente, y han sido empleadas como potenciales sustitutas del cuajo [1], pero los resultados no han sido muy prometedores debido a su elevada actividad proteolítica así como por la capacidad de producir péptidos amargos.[2]

Los coagulantes vegetales son una alternativa en la industria de alimentos, las plantas como fuentes de proteasas coagulantes ofrecen importantes ventajas, debido a su alta disponibilidad y a la diversidad de proteasas activas en una misma planta. Las proteasas de *Cynara cardunculus* es uno de los ejemplos más destacados, este cuajo vegetal es obtenido a partir de sus flores, ha sido utilizado para la producción de quesos como el Serra da Estrella y La Serena, cuyas características peculiares les han permitido su estatus de denominación de origen. En china, proteasas extraídas del rizoma de jengibre (Zingiber *officinale)* son utilizadas para la producción de una bebida tradicional elaborada a base de leche coagulada. Y en Nigeria los extractos de *calotropis procera* (Manzana de Sodoma) se han utilizado de manera tradicional para la producción de queso fresco. Actualmente una gran variedad de fuentes vegetales han sido estudiadas y caracterizadas en busca de proteasas con poder coagulante en la industria quesera.[3]

Para obtener el punto de gelificación de la leche durante la coagulación, se ha empleado la determinación del tiempo de coagulación, mediante el método de Berridge [4], que se basa en la observación visual de los primeros flóculos de caseína adheridos a la pared de vidrio de un tubo de ensayo, y que ha dado lugar a la publicación de diversas normas de la Federación Internacional de Lechería (FILIDF) más específicas (como la IDF 157A:1997, la IDF 176:2002 o la IDF 199:2006) utilizadas para caracterizar nuevos coagulantes, como los coagulantes vegetales.[2]

Guazuma Ulmifolia Lam es un Árbol mediano caducifolio de la familia *Sterculiaceae* 2 a 15 m de altura.[5] Esta especie es originaria de América tropical; habita principalmente zonas de climas cálido y semicálido, también presente en climas semi seco y templado. [6] El fruto es una cápsula de 3 a 4 cm de largo, en infrutescencias de 10 cm, ovoide, 5-valvada, abriéndose tardíamente, con numerosas protuberancias cónicas en la superficie, moreno oscura a negra cuando está madura, olor y sabor dulce. Las semillas se encuentra dentro del fruto y son numerosas (entre 40 a 80) de menos de 1 mm, duras, redondeadas, pardas.[5]

En la época prehispánica era utilizada por algunas tribus en México como remedio para problemas gastrointestinales, diarrea, hemorragias, problemas renales y dolor uterino. También es conocida por sus diversos nutrientes utilizada como alimento de forraje para ganado. En los últimos años ha sido utilizada para clarificación o purificación del agua.

A pesar sus diversas aplicaciones y usos la investigación sobre su utilización como fuente de enzimas de coagulación en la leche es escasa y casi nula. Con el fin de ahondar en el estudio de las actividades coagulantes de la leche del fruto de *Guazuma ulmifolia* Lam, en el presente estudio se realizó un ensayo preliminar en extractos crudos de cascara y semillas del fruto de *Guazuma ulmifolia* Lam. La actividad de coagulación de la leche se detectó en ambas partes del fruto de esta especie la presencia de coagulantes vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se recolectaron las muestras fruto de *Guazuma Ulmifolia* Lam en el Municipio de Teuchitlan Jalisco, en la zona de "Los Guachimontones" esta se e encuentra en el centro de la Zona Valles de Jalisco, con los extremos de las ***coordenadas*** 20°41'29"N 103°50'58"O / 20.691389, -103.849444.

Las muestras frescas se pelaron, separando las semillas y cascara del fruto. Posteriormente se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su uso. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Extracción enzimática

Se probaron distintas soluciones tampón para la extracción de los principios coagulantes del fruto de *Guazuma ulmifolia* Lam (cascara y semillas) maduro, estos fueron agua destilada, NaCl al 5% (en agua destilada), y NaCl al 5% en tampón de acetato sódico 0.5 M (pH 5,0). La muestra en bruto de *Guazuma ulmifolia* Lam (1,0 g para cada buffer) se trituró finamente mediante molino y se extrajo con 5 ml de cada extractante durante 12 h con agitación magnética. Los extractos se filtraron a través de papel Whatman No.12 y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes se dializaron durante toda la noche contra tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0.

Fracción de sulfato de amonio

El fraccionamiento con sulfato de amonio se llevó a cabo siguiendo el método descrito en otra parte. [7] Se añadió lentamente sulfato de amonio sólido con agitación a las preparaciones de extracto bruto (50 ml) hasta una saturación del 20%. Durante la adición de sulfato de amonio sólido, el pH de la solución enzimática se mantuvo a pH 5,0 por adición gota a gota de NH4OH al 7% o H2SO4 0,1 M y la mezcla se mantuvo a 4°C durante 30 min. Los precipitados se separaron del sobrenadante por centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. El sulfato de amonio sólido se añadió adicionalmente lentamente al sobrenadante hasta una saturación del 30% y la solución se mantuvo a 4°C durante 30 min. Antes de ser centrifugada a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4ºC. Este proceso se repitió para cada concentración de sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación del 60%. Los precipitados recogidos se disolvieron en un pequeño volumen (aproximadamente 10 ml) de tampón de acetato sódico 0.5 M, pH 5,0, y después se dializaron durante la noche a 4ºC contra el mismo tampón (1,0 litro) con varios cambios del tampón de diálisis. Las disoluciones dializadas se centrifugaron adicionalmente para eliminar cualquier partícula sólida, y se midieron su concentración de proteínas, coagulación de la leche.

Cuantificación de proteínas (Técnica de Lowry)

Se preparó una solución de sulfato cúprico al 1% denominando a esta como solución A, posteriormente se preparó una solución de tartrato de sodio y potasio al 2% denominada como solución B y una solución de carbonato de sodio al 2% preparado en hidróxido de sodio 1N denominada como solución C. Se preparó un solución 1N e reactivo de Folin Ciocalteu.[8]

Preparación del Reactivo de Biuret. (50 ml)

Se tomaron 0.5 ml se la solución A, 0.5 ml de la solución B y se mezclaron con 50 ml de la solución C.

Preparación de la solución concentrada de albúmina de suero bovina (BSA) 1000 µg/ml.
Se pesaron 5 mg de BSA en balanza analítica y se disolvieron en 5 ml de agua destilada, homogenizando la solución.

Curva de calibración
Se realizó una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de BSA, las soluciones se prepararon con concentración de 0-1 mg/ml, a partir de BSA y agua destilada (Buffer), llevándolas a un volumen final 400 µl.

Tabla 1. Concentraciones de BSA utilizadas para la elaboración de la curva de calibración

Concentración BSA (µg/ml)	Volumen de BSA (µl)	Volumen de Buffer (µl)
0	400	0
0.2	320	80
0.4	240	160
0.6	160	240
0.8	80	320
1	0	400

De cada concentración de la curva realizada se tomaron 100 µl con 200 µl del reactivo de Biuret por triplicado, se incubo durante 15 min. Posteriormente se añadió 20 µl de Folin Ciocalteu y se colocaron en una microplaca. Después de 30 minutos se realizó la lectura a 750 nm.[8]

Electroforesis SDS-PAGE 12%
Se preparó un gel de poliacrilamida del 12%, las muestras de extractos de semilla y cascara de Guazuma ulmifolia lam se diluyeron en un proporción 1:2 con el reactivo de Laemmli, 15µl de cada uno de estos extractos se colocó sobre el gel y se corrió en una cámara de electroforesis. Posteriormente se tiño el gel con azul de Coomassie.

Determinación de la actividad de coagulación de la leche
Se preparó el sustrato (10% de leche desnatada en CaCl2 0,01 M) y el pH se ajustó a 6,5. A continuación, se pre incubaron diez milímetros del sustrato durante 5 minutos a 37ºC, se añadieron 1,0 ml de extracto enzimático y se observó la formación de cuajada a 37ºC mientras se hacía girar manualmente el tubo de ensayo de vez en cuando. El punto final se registró cuando las partículas discretas fueron discernibles. [9]

DISCUSIÓN Y RESULTADOS
Actividad de coagulación por método de Berridge
Se encontró que los extractos de cascara y semilla tienen la capacidad para coagular leche con un tiempo de coagulación de entre 15 y 25 minutos. la que los buffers para la extracción enzimática más, rápida y eficiente fueron NaCl al 5% y Acetato de Sodio 0.1 M para cascara y NaCl al 5% en tampón de acetato de sodio 0.1M y Acetato de sodio 0.1 M pH 5,0 para semilla. En las **figuras 2 y 3** respectivamente se observa la leche coagulada con extractos de semilla y cascara de *Guazuma Ulmifolia* Lam.



Figura 1. *Muestra control, leche sin extracto coagulante.*

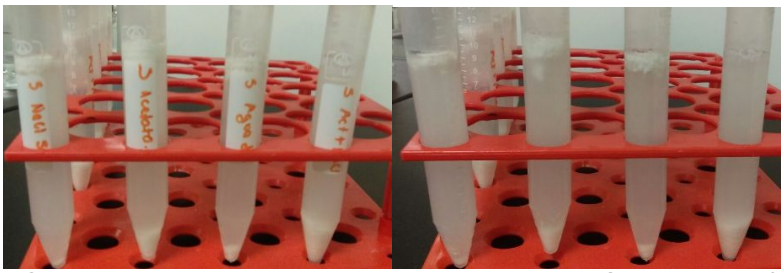


Figura 2. *Coagulación de leche con extractos de semilla de Guazuma ulmifolia* Lam.

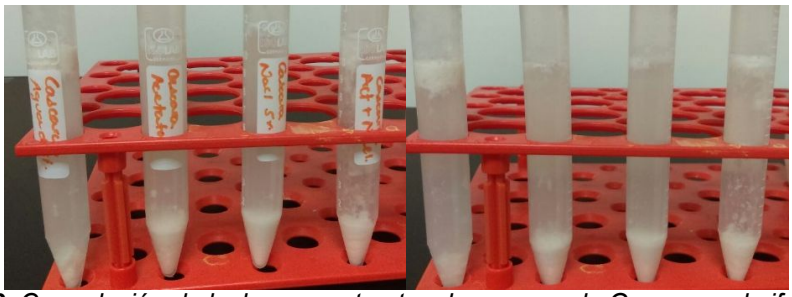


Figura 3. *Coagulación de leche con extractos de cascara de Guazuma ulmifolia* Lam.

Cuantificación de Proteínas Método Lowry

Se cuantificaron las proteínas de la cascara de *Guazuma Ulmifolia* Lam en diferentes buffers dando como resultado que en buffer de CH_3COONa pH 5 hay 0.3506 mg BSA/ml, Buffer de NaCl 5% en tampón de CH_3COONa 0.5M hay 0.4476 mg BSA/ml, Buffer de NaCl 5% hay 0.3013 mg BSA/ml y en Agua destilada hay 0.2823 mg BSA/ ml. En el caso de la semilla de *Guazuma Ulmifolia* Lam dio como resultado que en buffer de CH_3COONa pH 5 hay 0.3506 mg BSA/ml, Buffer de NaCl 5% en tampón de CH_3COONa 0.5M hay 0.4476 mg BSA/ml, Buffer de NaCl 5% hay 0.3013 mg BSA/ml y en Agua destilada hay 0.2823 mg BSA/ ml.

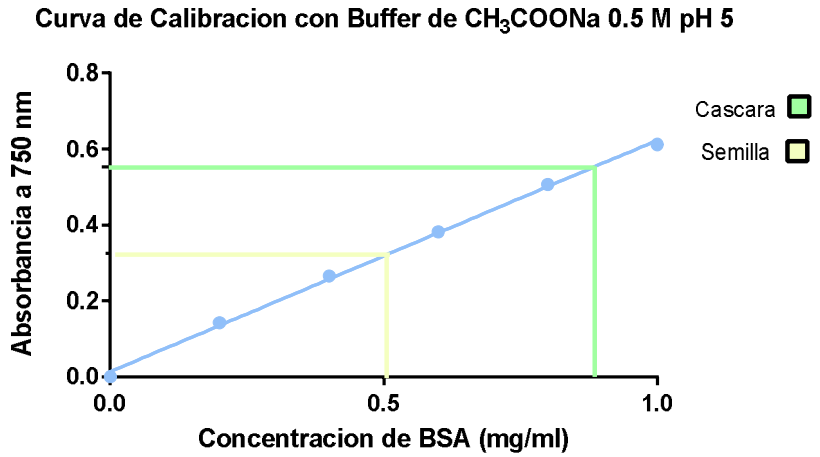


Figura 4. *Curva de calibración de extracto con buffer de CH_3COONa 0.5 M pH 5 e interpolación de absorbancia obtenida para las muestras de cascara y semilla de Guazuma Ulmifolia Lam.*

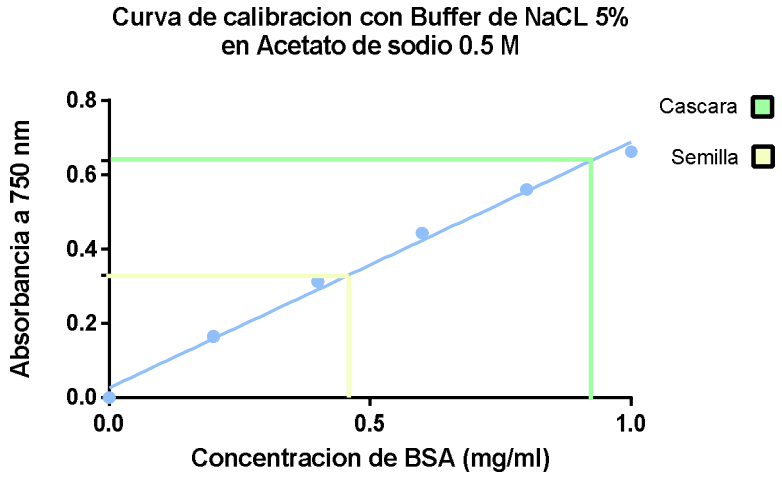


Figura 5. *Curva de calibración de extracto con buffer de NaCl en 5% CH_3COONa 0.5 M e interpolación de absorbancia obtenida para las muestras de cascara y semilla de Guazuma Ulmifolia Lam.*

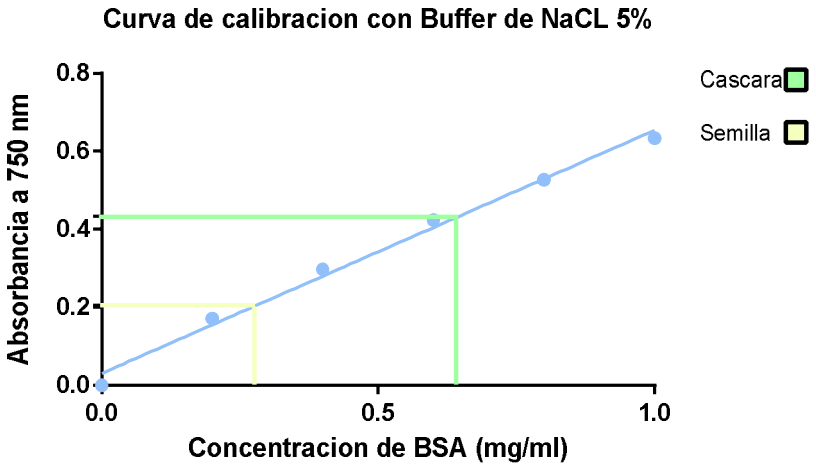


Figura 6. *Curva de calibración de extracto con buffer de NaCl en 5% e interpolación de absorbancia obtenida para las muestras de cascara y semilla de Guazuma Ulmifolia Lam.*

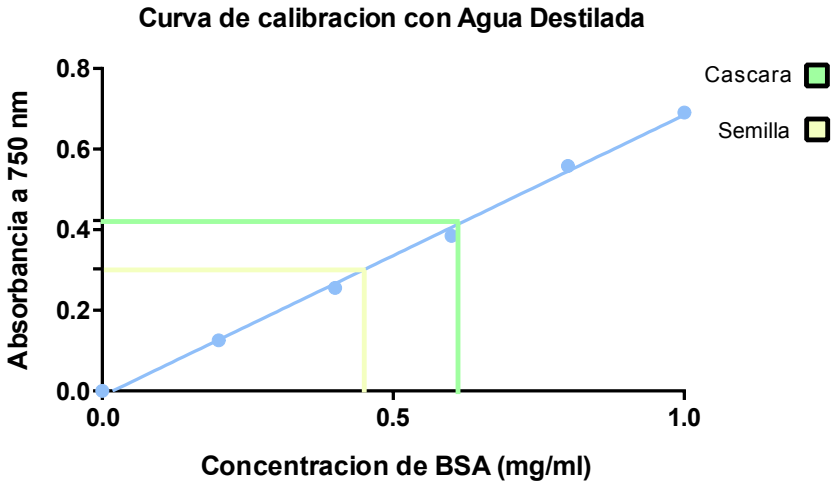


Figura 7. *Curva de calibración de extracto con buffer de NaCl en 5% CH_3COONa 0.5 M e interpolación de absorbancia obtenida para las muestras de cascara y semilla de Guazuma Ulmifolia Lam.*

Electroforesis SDS-PAGE al 12%

Las proteínas presentes en los extracto de semillas de Guazuma Ulmifolia Lam se presentan en la figura 8, las bandas marcadas de 1-4 pertenecen a los extractos de semilla y las bandas de 6-9 pertenecen a la cascara. El patrón de bandas ubicado en el numero 5 pertenece al marcador Blue Classic Prestained Protein Marker 250 µl. que va de 10 – 180 kDa.

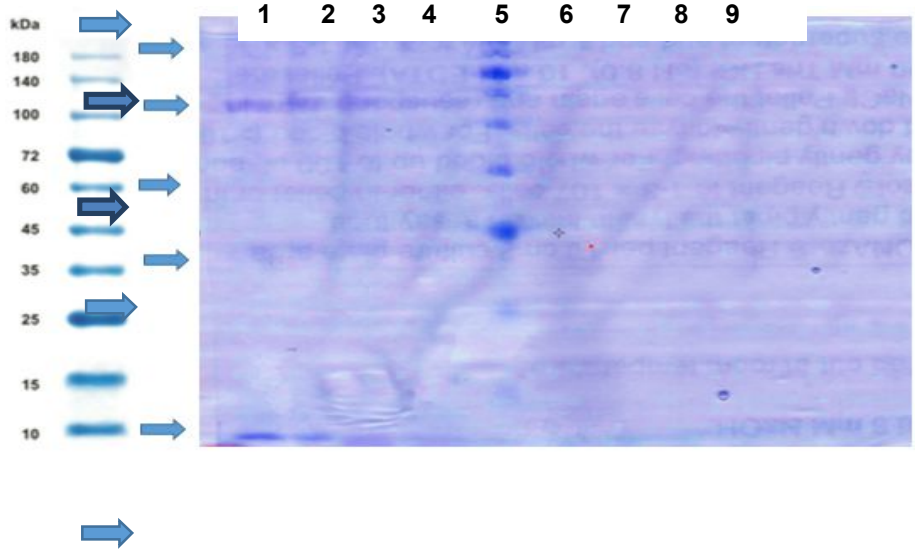


Figura 8. *Electroforesis SDS-PAGE 12%. En este gel se observan bandas significativas en 180, 100, 60, 35 y 10 kDa en 1, 2, 3 y 4 respectivamente estas bandas pertenecen a los extractos de semilla. En los carriles 6, 8 y 9 pertenecientes a los extractos de cascara no se observaron bandas significativas.*

Las bandas significativas que presento la prueba de SDS-PAGE al 12% entre 100 y 180 kDa pueden deberse a lipoproteínas de altos pesos moleculares. Proteínas como albumina y globulinas, se pueden presentar en la banda de entre los 12 y 72 kDa por lo tanto se puede decir que este tipo de proteínas están presentes en los extracto de semilla de *Guazuma ulmifolia* Lam. Sin embargo se necesitarían más estudios para profundizar en la caracterización de estas proteínas.

CONCLUSIÓN

Los extractos enzimáticos del fruto de *Guazuma Ulmifolia* Lam, son una fuente importante de proteasas con la capacidad de coagular la leche en tiempos comparables con la quimosina comercial. Debido a que los extractos muestran su mayor actividad coagulante a una temperatura de 37°C, es posible utilizarlos como una alternativa al cuajo convencional, obteniendo un cuajado en tiempos aceptables. Debido a la estabilidad térmica de las proteasas y su diversidad en los extractos enzimáticos, resulta necesario realizar estudios más profundos en la purificación y caracterización bioquímica de estas enzimas, para así establecer la aplicación de las proteasas de *Guazuma Ulmifolia* Lam en la industria quesera y en otras áreas biotecnológicas.

BIBLIOGRAFIA

[1] L. Roseiro, J. Gómez-Ruiz, M. García-Risco, and E. Molina, "Vegetable coagulant (Cynara cardunculus) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication," *INRA, EDP Sciences*, pp. 343–350, 2003.

[2] V. García, S. Rovira, Teruel, I. Roa, and López, "EMPLEO DE COAGULANTES VEGETALES EN LECHE DE CABRA MURCIANO-GRANADINA Use of vegetable coagulants in Murciano-Granadina goat milk," vol. 27, pp. 73–84, 2011.

[3] J. M. Moreno-Hernández, X. Desideria Hernández-Mancillas, E. Lorena, C. Navarrete, M. De, J. Bañuelos-Pérez, J. A. Salazar-Leyva, I. Osuna-Ruiz, A. Rodríguez-Tirado, M. Á. Mazorra-Manzano, A. Para, and J. M. Moreno-Hernández, "CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE Y CASEINOLÍTICA DE LAS PROTEASAS DEL FRUTO DE ' AGUAMA ' (Bromelia pinguin L.)," *Rev. ciencias Biol. y la salud*, vol. XIX, pp. 19–24, 2017.

[4] N. J. Berridge, "Some observations on the determination of the activity of rennet," *Analyst*, vol. 77, no. 911, p. 57b, 1952.

[5] "___ BIBLIOTECA ___," *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*, 2009. [Online]. Available: www.velvet.unam.mx.

[6] "Guazuma ulmifolia," *Méthodique, Botanique*. pp. 246–249, 1789.

[7] I. A. Mohamed Ahmed, A. Maimaiti, N. Mori, N. Yamanaka, and T. Taniguchi, "Simultaneous determination of β-alanine betaine and trimethylamine in bacterial culture and plant samples by capillary electrophoresis," *J. Anal. Sci. Technol.*, vol. 5, 2014.

[8] R. J. Randall and a Lewis, "The folin by oliver," *Readings*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.

[9] A. E. Tajalsir, A. S. A Ebraheem, A. M. Abdallah, F. J. Khider, M. O. Elsamani, and I. A. Mohamed Ahmed, "PARTIAL PURIFICATION OF MILK - CLOTTING ENZYME FROM THE SEEDS OF MORINGA OLEIFERA," *J. Microbiol. Biotechnol. food Sci.*, vol. 4, pp. 58–62, 2014.

EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE CREMA (pH Y ACIDEZ) DURANTE EL DESARROLLO DE QUESO CREMA Y SU IMPACTO EN LAS PROPIEDADES DE TEXTURA.

[1]Salazar-Pérez, C.O, [2]Nava-Álvarez, G.I., y [*1]Morales-Hernández, N.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Unidad de Tecnología Alimentaria, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, C.P. 45019, México.
2. Universidad Politécnica del Valle de Toluca, Ingeniería en Biotecnología, Toluca-Almoloya de Juárez, Santiaguito Tlalcilalcali, Almoloya de Juárez, Estado de México, C.P 50904.

*Autor para correspondencia: nmorales@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pH en la crema previo a la incorporación para la elaboración de un queso tipo crema. Se evaluó el contenido de acidez con respecto al cambio de pH. Los quesos cremas que se generaron (cuatro tratamientos, incluyendo un control de crema comercial sin modificar) obtuvieron diferente apariencia en cuanto a la presencia de grumos, desuerado y firmeza. El pH de los quesos fue entre 6.2 y 6.35, la humedad osciló en rangos de 63 a 68.7 %. Para la Aw fue alrededor de 0.97 entre todas las muestras, la acidez fue entre 0.43–0.6. Los valores obtenidos en la fuerza de gel (kg) de los diferentes tratamientos estuvo en rangos de 0.12 a 0.19 y la adhesividad fue de -0.22 a -0.28. Los diferentes cambios de pH en las muestras de queso crema afecto principalmente la fuerza de gel, generando quesos más suaves a pH 5.0.

Palabras clave: Crema; acidez; pH; queso crema.

INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, cuyas características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales difieren entre cada tipo. El queso crema se caracteriza por ser una emulsión láctea (O/W), su producción implica la acidificación por cultivos lácticos u otros donde se da textura por medio de tratamientos térmicos y homogenización. Se han identificado diversos factores como causantes de modificaciones en las propiedades del queso (microestructura, propiedades fisicoquímicas, texturales, reológicas y sensoriales), entre ellos la formulación, las condiciones de proceso y almacenamiento y las alteraciones provocadas por microorganismos.

La formulación y proceso conllevan a modificaciones en textura y propiedades fisicoquímicas del producto, uno de los factores de mayor impacto es el pH, el CODEX [1] establece un rango de pH de 4.6 a 5.2, produciéndose la desestabilización del sistema micelar a pH cercano a 5.1 y cuando el pH es disminuido hasta el punto isoeléctrico de las caseínas ocurre la formación de una red donde la concentración si es lo suficientemente alta, se forma un gel. En la homogenización se incorpora crema para aumentar el contenido graso y dar textura, sin embargo, podría ser factible incorporarla después de la formación de la cuajada.

Razón por la cual, la comprensión de los aspectos científico- técnicos en torno a la elaboración del queso es de suma importancia para un adecuado control de las condiciones que pudieran afectar dichas propiedades en el queso y en consecuencia su calidad y aceptación por parte del consumidor [2].

El objetivo de este trabajo fue estudiar la adición de crema (variando pH y evaluando acidez) sobre el comportamiento fisicoquímico y de textura de un queso tipo crema. Se varió el pH de 5.0 a 6.0 más una muestra control**.** A cada tratamiento se le midió la acidez previo a la incorporación a la cuajada, una vez formado el producto queso crema se determinaron los parámetros de pH, Aw, acidez, % humedad y fuerza de gel y adhesividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la formación de queso crema se utilizó leche pasteurizada semidescremada, leche en polvo light, crema ácida y cuajo natural. Estos ingredientes fueron obtenidos de un mercado local y los reactivos utilizados fueron grado alimenticio ($CaCl_2$ y ácido cítrico).

Métodos

Inicialmente se ajustó la crema a tres pH (5.0, 5.5 y 6.0) mediante la adición de suero previamente modificado a los pH antes mencionados, más la muestra control (crema sin modificación de pH). Se midió la acidez (expresada como ácido cítrico) respecto al cambio de pH en la crema comercial y teniendo de 0.4 a 0.6 % de acidez, posteriormente se preparó la cuajada para el desarrollo de queso crema mediante la metodología reportada por [3], la cual consta de las siguientes etapas: a) Estandarización: Se estandarizó la leche con leche en polvo, vertiéndola a una concentración de 1.2 %. b) Coagulación: en esta etapa se adiciono la enzima renina (cuajo) en mezcla con CaCl2 0.12 % ambos diluidos en agua y se dejó reposar durante 40 min. c) Cortado, desuerado y prensado: Se realizó un prensado durante 15 minutos sobre la cuajada para retirar la mayor cantidad de suero posible. d) Salado y batido: en esta etapa se incorpora la crema con la finalidad de impartir cremosidad al queso y aumentar su contenido graso, se realizó un batido durante 10 minutos para homogenizar la mezcla. Y finalmente se realizó el moldeo de los quesos para su final resguardo a temperatura de refrigeración hasta su uso en las pruebas evaluadas.

Para los análisis fisicoquímicos en el queso crema se llevaron a cabo bajo los métodos reportados por la AOAC evaluando de esta manera el pH, humedad, actividad de agua. Para la evaluación de la textura (fuerza de gel tomando como parámetros la dureza y adhesividad) se utilizó un texturómetro Texture Analyzer TA.XT Plus (Texture Technologies Corp), a una compresión del 30%. Las pruebas se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos de queso crema incorporados con crema ajustada a diferente pH.

En la Tabla 1, se reportan los valores obtenidos para la caracterización fisicoquímica de los tratamientos de queso crema, en los cuales se puede observar que el pH fue el único parámetro en el cual se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

Esto es atribuido a la previa modificación del pH de la crema (ajustando el suero de leche previo a la mezcla con crema ácida), lo cual se ve reflejado al momento de incorporar en la cuajada para dar formación al queso crema.

Tabla 1.- Caracterización fisicoquímica de quesos crema modificados con crema ajustada (pH).

	PARAMETRO FISICOQUÍMICO DEL PRODUCTO QUESO CREMA			
Crema	**pH**	**Acidez (%)**	**Actividad de agua (Aw)**	**Humedad (%)**
Control	6.29±0.02 [a]	0.50±0.08 [a]	0.97±0.001 [a]	63.8±0.8 [a]
pH 6.0	6.33±0.02 [a]	0.49±0.04 [a]	0.96±0.001 [a]	65.0±1.0 [a]
pH 5.5	6.2±0.01 [b]	0.51±0.03 [a]	0.97±0.002 [a]	65.0±2.1 [a]
pH 5.0	6.22±0.02 [b]	0.44±0.02 [a]	0.96±0.002 [a]	68.7±0.6 [a]

Se reportan promedios ± desviación estándar para cada tratamiento, los grupos con diferente letra (a o b) presentan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Sin embargo, esta modificación de pH no logro generar diferencias significativas ($p>0.05$) en la acidez de los tratamientos, quedando los valores muy similares al control. Esto fue similar para los otros parámetros fisicoquímicos evaluados (Aw y humedad). Además, se observaron cambios en la apariencia del producto como lo fue la presencia de grumos, desuerado y la untabilidad del mismo.
Este tipo de cambios en apariencia ya se ha reportado por otros autores como Coutouly y col. 2013 [4], reportando afectaciones en cuanto al brillo, untabilidad, luminosidad y sensación cremosa.

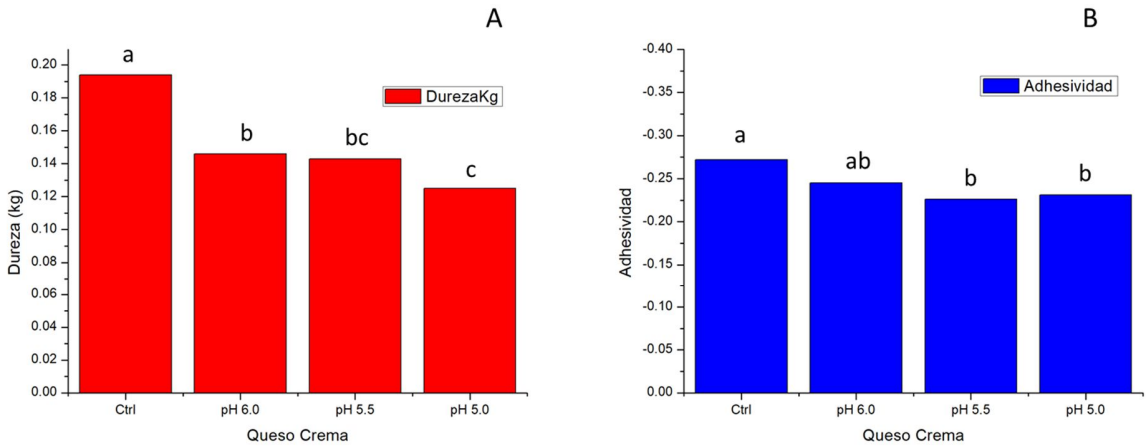


Fig. 1.- Fuerza de gel (Fig. 1 A) y adhesividad (Fig. 1 B) para los diferentes tratamientos de queso crema. Diferente letra en cada columna significa que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0.05$).

En la Fig. 1 se observa que el tratamiento incorporado con crema a pH 6.0 fue el más similar al tratamiento control en cuanto a la adhesividad, y en fuerza de gel los tratamientos con crema ajustada a diferente pH no lograron alcanzar la dureza presentada por el tratamiento control.

Esto es debido a que al incrementar el pH se genera una disminución de la firmeza en los quesos, debido al hinchamiento de las micelas de caseína provocando esto es aunado a que se incrementan las interacciones entre las caseínas y las moléculas de agua con dicho incremento; conllevando a afectaciones en cuanto a la generación de texturas suaves y a un incremento en las propiedades de fundido del queso crema [5].

CONCLUSIONES

El pH afecto principalmente la fuerza de gel, esto conllevo a la obtención de quesos crema más suaves en comparación con el queso control debido a la desestabilización del sistema micelar de las caseínas. Además, que también tuvo un efecto en cuanto a la apariencia del producto principalmente en cuanto a la presencia de grumos, desuerado y firmeza.

No se afectaron otras propiedades fisicoquímicas como lo son la actividad de agua, acidez y contenido de humedad con estos cambios de pH en crema.

REFERENCIAS

[1] 275, C., *Norma del CODEX para el Queso Crema*, in *CODEX STAN 275*. 1973.
[2] Ramirez-López, C., *Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad.* 2012.
[3] Carvajal - Cuéllar, D.M., *Estudio del comportamiento fisicoquímico y reológico de un queso untable* in *Ingeniería Química y Alimentos* 2004, Universidad de las Américas Puebla.

[4] Coutouly, A., Riaublanc, A., Axelos, M., Gaucher, I., *Effect of heat treatment, final pH of acidification, and homogenization pressure on the texture properties of cream cheese.* Dairy Science and Technology, 2014. **94**: p. 125-144.

[5] MONTEIRO, R.R., TAVARES, D.Q., KINDSTEDT, P.S., GIGANTE, M.L. , *Effect of pH onMicrostructure and Characteristics of Cream Cheese.* Food Chemistry, 2009. **74**: p. 112-117.

CARACTERIZACIÓN DE UN RESIDUO AGROINDUSTRIAL PROVENIENTE DEL PROCESAMIENTO DEL CAFÉ.

[1]Beltrán-Medina, E.A., [1]Guatemala-Morales, G.Ma., [2]Arriola-Guevara, E., [2]Corona-Gonzalez, R.I., [1]Mondragón-Cortés, P.M. y [1]Espinosa-Andrews, H.

1. Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnologiá y Diseño del Estado de Jalisco A.C, Av. Normalistas # 800, Colinas de la Normal, Guadalajara, Jal, 44270.
2. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierias, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino Garciá Barragán No. 1421, Guadalajara, Jal, 44430.

*Autor para correspondencia: es_ebeltran@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El rápido crecimiento de la industria de los alimentos procesados ha generado subproductos, que incluyen semillas, piel, vainas, cáscaras, cascarilla, troncos, cortezas, etc. Estos subproductos son conocidos por ser fuente de varios componentes bioactivos incluyendo fibra dietética. La posibilidad de uso de los subproductos provenientes del procesamiento de alimentos para elaborar varios alimentos para el consumo humano ha creado grandes expectativas para la reducción de desperdicios y la generación de ingresos indirectos. Actualmente, el café es producido en un gran número de países alrededor del mundo; sin embargo, sólo diez países productores de café son los responsables de aproximadamente el 80% de la producción mundial. En este contexto, México ocupa el décimo lugar, con una producción de 230 mil toneladas de café anuales. La cadena de producción del café consta de cuatro procesos fundamentales que son, la producción del grano, el beneficio húmedo del café, el beneficio seco y la industrialización del producto. Dentro del proceso de industrialización del café, se encuentra el tostado del grano, donde el principal subproducto es la cascarilla o piel de plata, la cual representa un 4.2% del grano de café [1,2]. Actualmente es utilizada para alimentación animal y generación de calor por combustión. Sin embargo, se requiere caracterizar este residuo para proponer alternativas de uso y generar valor agregado. En este trabajo, se determinó la composición bromatológica de la cascarilla de café, la actividad antioxidante por el método de ABTS, polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau y cuantificación de ácido clorogénico por HPLC [3]. Se obtuvo que la composición bromatológica de la cascarilla de café es 7.2% de humedad, 15.1% de proteínas, 5.5% de cenizas, 2.0% de grasas, 70.2% de carbohidratos totales y 34.7% de fibra cruda. El contenido de polifenoles totales es de 17.64+/-0.18 mg equivalentes de ácido gálico/g de cascarilla de café. La actividad antioxidante de la cascarilla, utilizando el método de ABTS, es de 32.1+/-0.01 mmol equivalente de Trolox/g de cascarilla de café. La concentración de ácido clorogénico, cuantificada por HPLC, es de 214.3 mg de ácido clorogénico/kg de cascarilla de café. La cascarilla de café podría considerarse como un nuevo ingrediente funcional de bajo costo para ser utilizado para incrementar la capacidad antioxidante de un amplio rango de productos alimenticios, así como aumentar el contenido de fibra y proteína.

Palabras clave: análisis bromatológico; ácido clorogénico; actividad antioxidante; HPLC

REFERENCIAS

[1] Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, "Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin", Food Bioprocess Technology, vol. 7, pp. 3493-3503, 2014.

[2] ICO (International Coffee Organization) [online] Disponible en: https://infogr.am/_/3QAP9f8u9wJf92hF6jnz, Oct. 2016

[3] Fujioka K., Shibamoto, T., "Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffes", Food Chemistry, vol. 106, pp. 217-221, 2008.

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE PECTINA A PARTIR DE RESIDUOS DE TORONJA Y MANDARINA.

Martínez-Castillo, J.I., Polanco-Lugo, E.M.A., González-Flores, T., Pacheco-López, N.A, y *Ayora-Talavera, T.R.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad Sureste, Tablaje Catastral 31264, Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto Km 5.5, Parque Científico Tecnológico de Yucatán, CP: 97302, Mérida, Yucatán, México.

*Autor para correspondencia: tayora@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La pectina es un biopolímero usado en la industria alimentaria por sus propiedades tecno-funcionales, la técnica convencional para extraer pectina afecta sus propiedades; por lo que existen métodos alternativos de extracción. El objetivo fue evaluar el efecto de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) en las propiedades fisicoquímicas de las pectinas de toronja y mandarina. La extracción se realizó en proporción 1:50 (w/v) con ácido cítrico, a 80ºC con una sonda ultrasónica a 20kHz de frecuencia y 130W de potencia. Se utilizó un diseño 2^2 para cada una de las pectinas; se evaluaron 2 amplitudes (80 y 90%) a 2 tiempos de extracción (15 y 30 min.); las variables de respuesta fueron el grado de esterificación y el rendimiento de extracción. Los rendimientos de extracción de pectina de toronja estuvieron 14-18%; mientras que los de mandarina entre 8-13%, además fueron pectinas de alto metoxilo, ya que el grado de esterificación de pectina de toronja estuvo entre 65-72%, mientras que en la de mandarina entre 64-70%. La EAU resultó ser eficaz en la extracción de pectinas de toronja y mandarina debido al rendimiento y propiedades obtenidas similares al método convencional, pero con una reducción de tiempo y reactivos.

Palabras clave: Pectina; cítricos; extracción asistida por ultrasonido.

INTRODUCCIÓN

La pectina es una sustancia encontrada en la pared celular de algunas plantas, en donde se considera el polisacárido más complejo por su estructura y funcionalidad. Este bipolímero participa en el crecimiento, morfología, desarrollo y defensa de las plantas; y además sirve como agente gelificante y estabilizador en diversos alimentos; también teniendo efectos positivos sobre la salud humana y, por tanto, múltiples usos biomédicos [1]. Principalmente, las aplicaciones de la pectina en los alimentos están determinadas por sus características químicas como el contenido de ácido galacturónico, el contenido de metoxilo, el grado de esterificación y el valor de acetilo [2].

Dichas características, están estrechamente relacionadas con su estructura, y esta a su vez con el método de extracción, poniendo de manifiesto la importancia estructural de la pectina, la cual fue descrita por Koubala y colaboradores (2008) [3] como una cadena lineal de unidades de ácido galacturónico unidos mediante enlaces covalentes que constituyen tres co-polímeros: el

homogalacturonano (HG), que comprende a la cadena lineal de enlaces α(1-4) de ácido D-galacturónico y que puede estar parcialmente esterificado con metanol en el C6 y posiblemente acetilesterificado en el C2 ó C3; el ramnogalacturonano I (RG-I), que conforma una cadena lineal con repeticiones del disacárido (1-2)-α-L-ramnosa-(1-4)-α-D-galacturónico; y el ramnogalacturonano II (RG-II), que se trata de residuos de galactosa, arabinosa y ramosa unidos al ácido D-galacturónico mediante enlaces α-(1-4). Estas estructuras pueden contener residuos de azúcares neutros principalmente arabinosa y galactosa, y en menor proporción de xilosa, ramnosa y glucosa, en forma de regiones ramificadas o cadenas laterales [4]–[7].

Sin embargo, para que la estructura de la pectina no se dañe durante su obtención es necesario regular las condiciones de extracción y el tratamiento posterior a la extracción; para lo cual es necesario una adecuada selección del método de extracción según la fuente de materia prima a usar, ya que en algunos casos si no se controlan las condiciones de extracción puede ser perjudicial en la pectina extraída, como ocurre en la extracción por el método convencional. Por tal motivo se han implementado métodos alternativos para extraer pectina, tal es el caso de la extracción asistida por ultrasonido (EAU), que ha sido descrita ampliamente en diversos artículos [8]–[10] como un método que mejora la transferencia de masa durante la extracción logrando rendimientos elevados, y además tiene una serie de ventajas especialmente la reducción del tiempo de extracción, la reducción del consumo de energía y un uso relativamente menor de disolventes en comparación con el método convencional [11].

Por tal motivo, este método se considera como una alternativa verde y rentable para la extracción de pectina, principalmente de subproductos de desecho de las agroindustrias[5], como los residuos de tomate [12], la cáscara de maracuyá [13], cáscara de granada [14], residuos de plátano [15], cáscara de mango [16], cáscara toronja [17] y orujo de uva [18], [19], entre otros; a pesar de esto, los cítricos siguen siendo la fuente principal debido a su elevado contenido de pectina en comparación con otras fuentes. No obstante, las condiciones de almacenamiento y procesamiento de esta materia prima antes de la extracción de pectina, puede repercutir en sus propiedades químicas e incluso en el rendimiento. Además, con el procesamiento de cítricos genera una gran cantidad de residuos orgánicos que no siempre son reutilizados, representando un severo problema de contaminación al medio ambiente; teniendo como alternativa el poder usarlos como fuente natural de pectina otorgándoles valor agregado, y, sobre todo, económico.

En este sentido el objetivo de esta investigación fue evaluar la extracción asistida por ultrasonido (EAU) en las propiedades químicas de las pectinas de residuos de cáscara de toronja y mandarina, realizando una comparación con el método de extracción convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de harinas

Los cítricos toronja (*Citrus paradisi* var. Star ruby) y mandarina (*Citrus reticulata* blanco var. Tangerina) se recolectaron en el municipio de Oxkutzcab, Yucatán, México. El procesamiento de los cítricos consistió extraer el zumo y utilizar solamente las cascaras para obtención de harinas, por lo que se llevó a cabo un deshidratado de los residuos a 60ºC, seguido de una molienda y tamizado (<0.3µm). Las harinas fueron almacenadas a 0ºC hasta su posterior uso.

Extracción de pectinas

Se realizó la extracción de las pectinas nativas de *C. paradisi* y *C. reticulata* mediante el empleo de técnicas de extracción convencionales y no convencionales (EAU).

Método convencional. Se utilizó la metodología utilizada por Kermani *et al.* (2014) [20]. Se dispersó cada una de las harinas en proporción 1:30 (w/v) en solución de ácido cítrico 0.1 N. La extracción se mantuvo durante 90 min. en agitación constante. Se evaluaron dos distintas temperaturas (80 y 90º C).

Extracción asistida por ultrasonido. Se utilizó la técnica asistida por ultrasonido (Wang *et al.*, 2015) [10]; se realizó una dispersión de cada harinas (toronja/mandarina) en proporción 1:50 (w/v) con dH_2O, se ajustó el pH a 2.5 utilizando ácido cítrico 1 M. La extracción se llevó a cabo usando un generador de ondas ultrasónicas ULTRASONIC-PROCESSOR (GEX130PB) conectado a una sonda ultrasónica (CV188) que emiten 130W de potencia a una frecuencia de 20 kHz. La temperatura de extracción se fijó en 80º C. Al finalizar cada extracción, se separó la materia orgánica del extracto y se dejó enfriar. La pectina fue precipitada con etanol 96º C en proporción 1:2 (v/v), secada a 40º C y triturada.

Caracterización a pectinas

A cada una de las pectinas extraídas por el método convencional se les realizaron los análisis correspondientes para determinar el grado de esterificación (% DE) y calcular el rendimiento (% Rend.), así como también se midió el pH, la acidez libre, y los parámetros de color CIELAB.

Rendimiento (% Rend). El rendimiento de extracción de cada pectina se expresó en porcentaje tal y como lo describe Wang y colaboradores (2015) [10] en la Ecuación 1.

(Ecuación 1)

$$\% \text{ Rend.} = (\text{Peso pectina} / \text{Peso harina}) \times (\text{Vol.}_i / \text{Vol.}_f) \times 100$$

Dónde: Vol._i = Volumen de la solución al comenzar la extracción

Vol._f = Volumen de la solución al terminar la extracción

Grado de esterificación (% DE). Se utilizó la técnica descrita por Bochek *et al. (*2001) [21] y Baltazar *et al.* (2013) [22]; se preparó una solución de pectina 1:20 (w/v) con agua libre de CO_2, enseguida se tituló con NaOH 0.1 N en presencia de fenolftaleína al 1%, la solución agitó durante 2 horas a temperatura ambiente (25º C) con un exceso de NaOH 0.1 N que posteriormente fue eliminado con HCl 0.1 N, para nuevamente repetir la titulación.

pH. La medición se realizó utilizando un potenciómetro calibrado Hanna-Instruments (HI-3222).

Determinación de acidez libre. Se siguió la metodología utilizada por Ramos & Pacheco (2015) [23], titulando la solución de pectina con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína al 1% como indicador.

Parámetros de color. Se utilizó un colorímetro MiniScanEZ hunterlab (4500L) para determinar los parámetros de color según lo establecido con el modelo CIELAB: L* (+blanco/negro-), a* (+rojo/verde-) y b* (+amarillo/azul-); y a partir de estos se calculó c* (saturación de color) y hº (ángulo de matiz)

Análisis estadístico.

Se utilizó un diseño factorial 2^2 para evaluar los factores en la extracción asistida por ultrasonido de pectina de toronja y mandarina (por separado). Se evaluaron 2 diferentes amplitudes de las ondas

ultrasónicas (80%, 90%) y 2 tiempos de extracción (15min, 30 min); se utilizaron como variable de respuesta la cantidad de pectina extraída con base en el rendimiento (%Rend.), y el grado de esterificación (%DE). Cada diseño se replicó 2 veces. Se empleó el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.I para analizar los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de pectina: método convencional.

El efecto de la temperatura en la extracción convencional de las pectinas cítricas evaluadas se presenta en la Tabla 1, Koubala *et al.* (2008) [25] mencionan que este factor puede influir en el rendimiento y estructura de la pectina, sin embargo, no se observó diferencias estadísticas ($p>0.05$) en cuanto al % Rend. y % DE al evaluar dos temperaturas de extracción (80 y 90º C). A pesar de lo anterior, se estableció el empleo de la temperatura a 80º C en la EAU, debido a que temperaturas mayores por un tiempo prolongado podrían dañar la estructura de la biomolécula [8].

Tabla 1. Matriz de diseño de la extracción de pectinas, método convencional

Tipo de pectina	80º C		90º C	
	% DE	% Rend.	% DE	% Rend.
Pectina de toronja	84.25+2.98^{a}	14.52+0.02^{b}	74.68+3.36^{a}	23.61+5.55^{b}
Pectina de mandarina	82.80+3.66^{a}	14.11+4.70^{b}	77.92+2.39^{a}	16.18+6.78^{b}

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre las 2 temperaturas utilizadas.

Además el % DE de la pectina de toronja se encontró entre 74.68-84.25%,siendo similar al 71.61% ya reportado en una extracción a 90º C para este cítrico [26]; mientras que los valores del %Rend. se localizaron entre 14.52-23.61%, coincidiendo a los reportados para extracción de pectina de toronja del 21.1 [27], 18 [28] y 19.16% [26]. Por otra parte, en la pectina de mandarina no existen diferencias estadísticas significativas ($p> 0.05$) en el %DE evaluando el efecto de temperatura (Tabla 1); en cuanto al rendimiento, se han reportado valores para este cítrico mucho menores (9.4-10.5%) que los de toronja [30]; sin embargo el valor obtenido dé %Rend. fue entre 14.11-16.18% el cual no tiene diferencias significativas ($p>0.05$) a 18% reportado para este cítrico [31].

En cuanto a la caracterización fisicoquímica (Tabla 2), ambas pectinas presentaron valores de alto metoxilo, debido a que contienen más de 50% de los grupos carboxilos esterificados [32]; el contenido de acidez es inferior a 1.5-3.0 meq de ácidos carboxílicos/g reportados [23]. En cuanto al pH, este fue ácido (alrededor de 3), característico de la pectina.

En cuanto al color de las pectinas extraídas, estas fueron significativamente menos luminosas en comparación con la pectina comercial (75.91$\pm$0.99), la cual es más blanca, lo que puede indicar la oxidación de algunos pigmentos naturales y azúcares presentes en los muestra por efecto de la temperatura de extracción y/o secado; además, las pectinas de toronja y mandarina fueron

significativamente diferentes en la percepción de color verde en comparación con la comercial (a*); la percepción del color amarillo (b*) fue significativamente mayor en la pectina de mandarina extraída a 80ºC, la cual tiene una saturación de color fuerte; la tonalidad de color (hº) entre las pectinas extraídas no presenta diferencias significativas, con excepción de la pectina comercial. Lo anterior explica que, la temperatura durante la extracción influye significativamente en el color de la pectina.

Tabla 2. Caracterización de pectinas extraídas convencionalmente.

Parámetro		Pectina toronja		Pectina mandarina		Pectina comercial
		80º C	90º C	80º C	90º C	
pH		3.46+0.07^{a}	3.46+0.38^{a}	3.69+0.13^{a}	3.63+0.28^{a}	3.55+0.59^{a}
% DE		84.25+2.98^{a}	74.68+3.36^{a}	82.80+3.66^{a}	77.92+2.39^{a}	84.49+1.72^{a}
Acidez libre		0.73+0.12^{a}	1.29+0.33^{a}	0.63+0.11^{a}	0.96+0.03^{a}	0.61+0.02^{a}
Color	L*	51.56+0.32^{a}	34.19+0.36^{c}	45.94+2.20^{b}	43.6+0.91^{b}	75.91+0.99^{d}
	a*	6.17+3.21^{a}	9.86+0.12^{b}	8.16+0.65^{a,b}	8.97+0.09^{a,b}	2.77+0.12^{c}
	b*	14.56+1.63^{a}	19.17+0.61^{b}	26.04+0.99^{c}	21.69+0.35^{b,d}	15.74+0.35^{a}
	c*	17.45+2.29^{a}	21.55+0.6^{b}	27.29+1.13^{c}	23.46+0.29^{d}	15.97+0.36^{a}
	hº	77.96+6.04^{a}	75.15+0.55^{a,c}	84.39+0.50^{a,b}	80.28+0.48^{a}	88.22+0.07^{b}

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Extracción de pectina: técnica asistida por ultrasonido

El rendimiento de la pectina de toronja extraída por ultrasonido se encontró entre 14-18% (Tabla 3) similar al obtenido por Bagherian et al. (2011) [26], sin embargo se han llegado a reportar valores de hasta 27.34% [17] y 26.74% [33] en condiciones elevadas de potencia, ya que el colapso de la burbuja de cavitación se hace más violento al aumentar la potencia. En cuanto al % DE de las pectinas obtenidas por EAU, se mantuvo entre 65-72%, representando una ligera disminución en comparación con la pectina obtenida por el método convencional (75-84%), esto puede ser atribuido a que intensidades elevadas de sonicación pueden ocasionar una degradación de estructura de la pectina, y por consecuente una disminución en los grupos carboxilo esterificados [10].

Tabla 3. Matriz de diseño de la extracción de pectina de toronja, EAU.

Tipo de pectina	Amplitud (%)	Tiempo (min)	% DE	% Rend.
Toronja	80 (-1)	15 (-1)	65.72+0.53^{a}	14.83+1.18^{a}
Toronja	90 (+1)	15 (-1)	72.95+4.68^{a}	16.48+2.66^{a}
Toronja	80 (-1)	30 (+1)	67.29+13.12^{a}	18.35+4.88^{a}
Toronja	90 (+1)	30 (+1)	72.14+0.10^{a}	18.88+1.54^{a}

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

El análisis de varianza del rendimiento de extracción de pectina de toronja muestra que no existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre la amplitud ($p=0.5875$) y el tiempo de extracción ($p=0.1765$). Sin embargo, con un mayor tiempo de extracción (30min) a una amplitud elevada se puede obtener una mayor cantidad de pectina. A mayor amplitud (80-90%) aumenta la eficiencia en la extracción de materia vegetal en comparación con amplitudes bajas [34], tal como se observa en la Tabla 3. Del mismo modo, en cuanto al grado de esterificación obtenido en la pectina de toronja, no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas con la variación de la amplitud ($p=0.2317$) y el tiempo de extracción ($p=0.9352$); a pesar de esto, el controlar la amplitud de las ondas ultrasónicas durante la extracción permite obtener pectinas altamente esterificadas.

Por otra parte el rendimiento de extracción de pectina de mandarina se encontró entre 8-13% (Tabla 4), valor inferior en comparación con la pectina de toronja, estos valores concuerdan con valores ya reportados para este cítrico de 10.5% [30]. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los niveles de amplitud ($p=0.7925$) y tiempo ($p=0.8967$) utilizados. De igual manera, no existen diferencias significativas en el % DE (amplitud $p=0.9768$, tiempo $p=0.9710$), por lo que si se desea obtener una mayor cantidad de pectina de mandarina es independiente el nivel de cada factor que se utilice. No obstante, el rendimiento de extracción de pectina de mandarina es significativamente más más bajo en comparación con la pectina de toronja ($p=0.009$) (Tabla 3 y 4), por lo que es importante mencionar que el rendimiento y estructura de la pectina puede verse influenciada por la materia prima, en este caso por el tratamiento recibido, y por ende su composición [35].

Tabla 4. Matriz de diseño de la extracción de pectina de mandarina, ultrasonido

Tipo de harina	Amplitud (%)	Tiempo (min)	% DE	% Rend.
Mandarina	80 (-1)	15 (-1)	64.77+8.30[a]	13.07+2.75[a]
Mandarina	90 (+1)	15 (-1)	69.81+4.46[a]	9.33+2.48[a]
Mandarina	80 (-1)	30 (+1)	70.12+3.93[a]	8.17+3.77[a]
Mandarina	90 (+1)	30 (+1)	64.81+6.71[a]	13.46+3.10[a]

Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2). Las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

CONCLUSIONES

La extracción asistida por ultrasonido favoreció rendimientos de pectina similares a los obtenidos por el método de extracción convencional, pero con la considerable reducción en el tiempo y la cantidad de ácido utilizado cítrico utilizado. De igual modo favoreció la obtención de pectinas altamente esterificadas.

La principal variable de respuesta a evaluar para ambos métodos de extracción fue el rendimiento, el cual es afectado por la temperatura para el método convencional y por la amplitud par el método de ultrasonido. La composición de las harinas cítricas utilizadas pudo afectar negativamente el rendimiento

REFERENCIAS

[1] D. Mohnen, "Pectin structure and biosynthesis," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 11, pp. 266–277,

2008.

[2] P. L. Bush, *Pectin : Chemical Properties, Uses and Health Benefits*. New York: Nova Science Publishers, Inc, 2014.

[3] B. B. Koubala, G. Kansci, L. I. Mbome, M. J. Crepeau, J. F. Thibault, and M. C. Ralet, "Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from 'Améliorée' and 'Mango' mango peels," *Food Hydrocoll.*, vol. 22, pp. 1345–1351, 2008.

[4] K. Lefsih, C. Delattre, G. Pierre, P. Michaud, T. M. Aminabhavi, F. Dahmoune, and K. Madani, "International Journal of Biological Macromolecules Extraction , characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of Opuntia ficus indica," vol. 82, pp. 645–652, 2016.

[5] F. Onyango Ogutu and T. Mu, "Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 38, pp. 726–734, 2017.

[6] B. L. Ridley, M. A. O´Neill, and D. Mohnen, "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling," *Phytochemistry*, vol. 57, pp. 929–967, 2001.

[7] N. J. López Martínez, J. A. Sañudo Barajas, C. Noé Aguilar, R. Rodríguez Herrera, and J. C. Contreras Esquivel, "Pectina de mango: perspectivas para su extracción," *Revista de Divulgación Científica Humanística y de Tecnología Ciencia-Cierta*, no. 27, Saltillo, Coahuila, México, 2011.

[8] L. Ridwan Adetunji, A. Adekunle, V. Orsat, and V. Raghavan, "Advances in the pectin production process using novel extraction techniques : A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 62, no. 168, pp. 227–239, 2017.

[9] S. Q. Liew, G. C. Ngoh, R. Yusoff, and W. H. Teoh, "Sequential ultrasound-microwave assisted acid extraction (UMAE) of pectin from pomelo peels," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 93, pp. 426–435, 2016.

[10] W. Wang, X. Ma, Y. Xu, Y. Cao, Z. Jiang, T. Ding, X. Ye, and D. Liu, "Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel : Optimization and comparison with the conventional method," *FOOD Chem.*, vol. 178, pp. 106–114, 2015.

[11] J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, and A. K. M. Omar, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review," *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, 2013.

[12] A. Ninčević Grassino, M. Brnčić, D. Vikić-Topić, S. Roca, M. Dent, and S. Rimac Brnčić, "Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste," *Food Chem.*, vol. 198, pp. 93–100, 2016.

[13] C. Freitas de Oliveira, D. Giordani, R. Lutckemier, P. Deyse Gurak, F. Cladera-Olivera, and L. D. Ferreira Marczak, "Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 110–115, 2016.

[14] I. Ganesh Moorthy, J. Prakash Maran, S. Muneeswari Surya, S. Naganyashree, and C. S. Shivamathi, "Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 1323–1328, 2015.

[15] J. Prakash Maran, B. Priya, N. A. Al-dhabi, K. Ponmurugan, I. Ganesh Moorthy, and N. Sivarajasekar, "Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of Musa balbisiana," *Ultrason. - Sonochemistry*, vol. 35, pp. 204–209, 2017.

[16] M. Wang, B. Huang, C. Fan, K. Zhao, H. Hu, X. Xu, S. Pan, and F. Liu, "Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 91, pp. 794–803, 2016.

[17] Y. Xu, L. Zhang, Y. Bailina, Z. Ge, T. Ding, X. Ye, and D. Liu, "Effects of ultrasound and/or heating

on the extraction of pectin from grapefruit peel," *J. Food Eng.*, vol. 126, pp. 72–81, 2014.

[18] R. Minjares-Fuentes, A. Femenia, M. C. Garau, J. A. Meza-velázquez, S. Simal, and C. Rosselló, "Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid : A response surface methodology approach," *Carbohydr. Polym.*, vol. 106, pp. 179–189, 2014.

[19] M. R. González-Centeno, K. Knoerzer, H. Sabarez, S. Simal, C. Rosselló, and A. Femenia, "Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (Vitis vinifera L.) – A response surface approach," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 21, pp. 2176–2184, 2014.

[20] Z. Jamsazzadeh Kermani, A. Shpigelman, C. Kyomugasho, S. Van Buggenhout, M. Ramezani, A. M. Van Loey, and M. E. Hendrickx, "The impact of extraction with a chelating agent under acidic conditions on the cell wall polymers of mango peel," *Food Chem.*, vol. 161, pp. 199–207, 2014.

[21] A. M. Bochek, N. M. Zabivalova, and G. A. Petropavlovskii, "Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid," *Macromol. Chem. Polym. Mater.*, vol. 74, no. 5, pp. 796–799, 2001.

[22] R. Baltazar Flores, D. Carbajal Mariños, N. Baca Rodríguez, and D. Salvador Rodríguez, "Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (Citrus medica) utilizando la metodología de superficie de respuesta," *Agroindustrial Sci.*, vol. 2, pp. 77–89, 2013.

[23] C. A. Ramos Chan and N. A. López, Pacheco, "Extracción y caracterización de pectina obtenida a partir de harina de subproductos de limón persa (Citrus latifolia Tanaka) derivada de un proceso secuencial," Universidad Autónoma de Yucatán, 2015.

[24] J. Montoya-López, G. A. Giraldo-Giraldo, and J. C. Lucas-Aguirre, "Determinación del indice de blancura en harina de trigo comercial," *Vitae*, vol. 19, no. 1, pp. S415–S416, 2012.

[25] B. B. Koubala, L. I. Mbome, G. Kansci, F. Tchouanguep Mbiapo, M. J. Crepeau, J. F. Thibault, and M. C. Ralet, "Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (Spondias cytherea) obtained using different extraction conditions," *Food Chem.*, vol. 106, no. 3, pp. 1202–1207, 2008.

[26] H. Bagherian, F. Zokaee Ashtiani, A. Fouladitajar, and M. Mohtashamy, "Comparisons between conventional , microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 50, no. 11–12, pp. 1237–1243, 2011.

[27] N. Arslan and H. Togrul, "Filtration of Pectin Extract from Grapefruit Peel and Viscosity of Pectin Solutions," *J. Food Eng.*, vol. 27, pp. 191–201, Dec. 1996.

[28] S. Yeoh, J. Shi, and T. A. G. Langrish, *Comparisons between different techniques for water-based extracted of pectin from orange peels*, vol. 218. 2008.

[29] M. Kratchanova, E. Pavlova, and I. Panchev, "The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 56, pp. 181–185, 2004.

[30] C. Chang-won, L. Do-youn, and K. Chan-wha, "Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system," *Carbohydr. Polym.*, vol. 54, pp. 21–26, 2003.

[31] J. P. Rojas, A. Perea, and E. E. Stashenko, "Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos," *Vitae*, vol. 16, no. 1, pp. 110–115, 2009.

[32] D. S. Aldana-Villarruel, C. N. Aguilar-González, J. C. Contreras-Esquivel, and G. V. Nevárez-Moorillon, "Moléculas pécticas: extracción y su potencial aplicación como empaque," *Tecnociencia*, vol. 5, no. 2, pp. 76–82, 2011.

[33] W. Wang, X. Ma, P. Jiang, L. Hu, Z. Zhi, J. Chen, T. Ding, X. Ye, and D. Liu, "Characterization of pectin from grapefruit peel : A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions," *Food Hydrocoll.*, vol. 61, pp. 730–739, 2016.

[34] R. Neria De la Cruz, N. Cruz Casino, E. M. Sandoval Gallegos, T. Sumaya Martínez, and R. Cariño Cortes, "Optimización de la extracción por termoultrasonido de compuestos antioxidantes a partir de residuos de mango (Mangifera indica L.), utilizando la metodología de superficie de respuestae," *Bol. Científico Ciencias la Salud*, vol. 4, no. 7, 2015.

[35] F. J. Muñoz Ordoñez and M. S. Hernández Gómez, "Extracción y caracterización de la pectina obtenida a partir del fruto de dos ecotipos de cocona (Solanum sessiliflorum), en diferentes grados de madurez; a nivel planta piloto," Universidad Nacional de Colombia, 2011.

[36] K. D. Mahrer, "Some considerations when abstracting," *Geophysics*, vol. 58, no. 1. pp. 10–11, 1993.

[37] M. Weiss and A. M. Newman, "A guide to writing articles in energy science," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 11, pp. 3941–3948, 2011.

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA CALIDAD FISICOQUÍMICA Y CONTENIDO DE FITOCOMPUESTOS EN CHILE PIQUÍN (*Capsicum annum* var. aviculare).

[1]Núñez-Serrano, A.S., [2]Rodríguez-Buenfil, I.N., [3]García-Márquez, E., [3]García-Fajardo, J.A., [4]Esquivel-Hernández, D.A., y [3]*Reyes-Vázquez, N.C.

1 UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Pedro de Alba, s/n. San Nicolás de los Garza, N.L.,
2 CIATEJ, Unidad Sureste. Tablaje Catastral 31264 Km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto. Parque Científico Tecnológico de Yucatán, Mérida, Yuc. CP. 97302.
3 CIATEJ Unidad Noreste. Vía de la Innovación 404. Autopista Mty-Aeropuerto km 10. Parque PIIT. Apodaca, N.L. CP. 66629.
4 Grupo Wecarenatural, S.A. de C.V. Boulevard Puerta del Sol 270, Monterrey, N.L. CP. 64630.

*Autor para correspondencia: nreyes@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
El chile piquín es fuente de compuestos bioactivos, por lo que puede contribuir con la ingesta de fitocompuestos con actividad antioxidante. Éste se consume principalmente en fresco, siendo almacenado en refrigeración y temperatura ambiente. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre su calidad físico-química, contenido de fitocompuestos. En este trabajo se utilizó lote de 8 Kg de piquín verde, que se almacenó en muestras de 220 g a 4 y 35 °C, evaluándose su humedad, pH, acidez °Brix, color, y a partir de extractos metanólicos se determinaron polifenoles, flavonoides y capsaicinoides totales y con acetonitrilo capsaicinoides totales. Los resultados indicaron que a 35 °C disminuyó significativamente su acidez. Tanto la temperatura como el tiempo de almacenamiento influyeron significativamente en los parámetros de color (L*, a*, b*). A 35 °C perdió luminosidad, cambiando de verde a rojo, y disminuyendo el amarillo respecto a 4 °C. A 35 °C se incrementó significativamente el contenido de fenoles totales y flavonoides y capsaicinoides a 34, 18 y 23 % % respectivamente con relación a 4°C. El almacenamiento del chile piquín a temperaturas promedio ambientales incrementó el contenido fitocompuestos, modificando color y acidez.

Palabras clave: *Capsicum annum* var. Aviculare; chile piquín; características fisicoquímicas; polifenoles; flavonoides; capsaicinoides totales.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* comprende cinco especies de importancia económica, y más de 200 variedades, de las cuales *Capsicum annum* L. variedad aviculare, conocido como chile piquín o chiltepín tiene gran aceptación en diferentes regiones de México, pero principalmente en el noreste del país, en donde su consumo per cápita es de 5 a 10 kg anuales [1].

En los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas se produce y consume este fruto. El consumidor prefiere el chile piquín por su sabor y picor ya sea seco, encurtido o fresco, especialmente en estado de

madurez verde. Generalmente el chile es almacenado hasta su consumo, ya sea a temperatura ambiente,

aunque superior a los 30 °C o en refrigeración comercial, 4 ºC. Por lo que tanto, el estado de madurez, y/o condiciones en las que se almacena puede influir en su calidad comercial, y variar la concentración de fitocompuestos contenidos en el chiltepín. Sin embargo, hasta el momento no existen trabajos que evalúen tales condiciones de este producto peculiar consumido en esta región.

Algunos estudios han indicado que el piquín verde presentó hasta un 35 % más de capsaicina total respecto al rojo [2]. Adicionalmente, reportes han señalado que el tipo de procesamiento, pero fundamentalmente la temperatura a la cual se somete el chile previo a su consumo puede afectar las características de calidad y los contenidos de capsaicina y fitonutrientes [3]. En este sentido, evaluaron el efecto de cocción por hervido y asado en chiles Poblano, Campana, Caribe, Jalapeño, Serrano, Habanero y Manzano sobre capsaicinoides, fenoles totales y color. Estos chiles presentaron pérdidas entre 1 a 28 % de capsaicinoides durante el hervido. Pero, incrementos por asado del 3 a 924%. El tratamiento secuencial de hervido y asado incrementó entre 7 al 137% los polifenoles totales en chiles pungentes, pero lo redujo del 2 al 26% cuando se hirvieron los chiles no pungentes. En otro estudio [4], ha señalado que el proceso de ahumado del chile fresco para producir chile chipotle utilizando madera de cáscara de nuez a 65 ºC y 75 °C, produjo un incremento en el total de fenoles y flavonoides del orden de 3.76 y 12 % respectivamente, y decrementos de 42 y 36 % de vitamina C y capsaicinoides respecto al chile jalapeño fresco, concluyendo que el proceso de ahumado produce un incremento significativo en los fenoles y flavonoides presentes en el chile. Aunque, se requieren estudios adicionales de parámetros individuales que confirmen el aumento de estos fitocompuestos [4]. Asimismo, otras contribuciones sugieren que el secado de chile rojo a 50 °C produjo respecto al chile fresco decrementos en sólidos solubles de 11.33 y 4.20 %, acidez de 0.35 a 0.11%, incrementando el pH de 4.7 a 5.3 respectivamente. Adicionalmente, tanto la vitamina C como fenoles totales se redujeron aproximadamente en 70% en ambos casos [5].

Por lo que, este estudio pretende elucidar si las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento en el chile piquín verde cultivado en Nuevo León tiene algún efecto sobre las características de calidad como pH, acidez, color, contenido de sólidos solubles, flavonoides, fenoles y capsaicinoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Materia prima. Lote de 8 kg de chile piquín verde *(Capsicum annuum* var. aviculare*)* adquirido en el mercado Juárez de Monterrey N.L con fecha 15 de mayo del 2017 y conservado en refrigeración a 4 °C durante una semana hasta su procesamiento.



Fig. 1 Aspecto del lote de chile piquín verde y almacenamiento

Envases. Bolsas de polietileno estériles de baja densidad de 250 g cada una.

Métodos

Preparación de la muestra y almacenamiento. El chile piquín entero se limpió en forma manual, separando la materia extraña, seleccionándose en forma visual mediante color, y sin signos de daños. El producto fue lavado, luego se sumergió en agua clorada al 0.01% durante 30 minutos para desinfectar. Enseguida fue secado sobre papel adsorbente por 12 horas a temperatura ambiente. En condiciones asépticas se pesaron muestras de 220g de chile piquín en bolsas de polietileno, obteniéndose en total 40 bolsas. Veinte muestras de 220 g fueron almacenadas por 9 días a 4°C y el resto se mantuvo durante el mismo periodo a 35°C dentro de una estufa (NOVATECH HS35-AID).

Muestreo. Para cada temperatura, se realizaron muestreos periódicos replicados (días 0, 1, 3, 5, 7 y 9). Las muestras fueron analizadas fisicoquímicamente: humedad, pH, sólidos solubles (°Brix), acidez y color. Así como flavonoides, fenoles y capsaicinoides totales. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Métodos analíticos. Tratamiento de la muestra. A partir de cada muestra se tomaron 10 g de chile fresco para las determinaciones de humedad, y con el fin de facilitar la homogeneización de la muestra los 210g restantes de chile se les agregó agua previamente hervida y enfriada, en una relación 2:1, esta mezcla se molió finamente en un molino (IKA All básic) hasta obtener una pasta homogénea. De cada muestra homogeneizada, aproximadamente 100g fueron utilizados para análisis de calidad fisicoquímica y el resto fue liofilizado (Free Zone 4.5L LABCONCO) a 50°C/0.018 Torr, y posteriormente molida con ayuda de un mortero y tamizada al través de un cedazo de 1 mm para finalmente almacenarse en oscuridad a 4 °C para análisis de fitocompuestos. Las muestras liofilizadas fueron analizadas en su contenido de humedad antes y después de la liofilización.

Análisis físico-químico del chile. Humedad. Mediante diferencia de peso a 100 °C utilizando una estufa NOVATECH HS35-AID.

pH. Según la NMX-F-317-S-1978, utilizando un potenciómetro (Thermo scienfitic ORION star A215), previamente calibrado a pH 4, 7 y 10.

Acidez. De acuerdo a la NMX-F-102-S1978, mediante titulación con 0.1N NaOH y expresado en porcentaje de ácido cítrico.

Sólidos solubles. Mediante a la NMX-F-436-SCFI-2011, usando un refractómetro (ATAGO Master) con una escala de 0.0 a 95 °Brix, previamente calibrado.

Color. Evaluado mediante una prueba no destructiva instrumental utilizando el colorímetro (HunterLab Color Flex 45/0) con condiciones de iluminación: iluminante C o D65. El equipo fue calibrado previamente con los estándares blanco y negro suministrados con el equipo.
La muestra se colocó frente al puerto de reflectancia y se procedió a realizar la medición con la escala Hunter y en los parámetros L*, a* y b. Las lecturas fueron tomadas por quintuplicado.

Determinación de fitocompuestos. Obtención de extractos. Se obtuvieron extractos utilizando 2gr de chile seco liofilizado, y 20 mL de metanol al 80%. La mezcla de liofilizado y extractante fueron mezclados por 30 s, enseguida, la muestra fue sonicada en Baño ultrasónico (Branson H2800H) durante 30 minutos. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C (Thermo Scientific Heraeus MegaFuge 16R). El sobrenadante fue filtrado sobre papel Whatman #4, recolectando el extracto en material de borosilicato. El procedimiento se realizó dos veces. Los extractos fueron mezclados, estandarizando los volúmenes colectados y guardaron a -80°C hasta análisis posterior. La cuantificación de fitocompuestos fue realizado de acuerdo a [6] y a continuación se describen.

Fenoles totales. 50 µL del extracto fueron mezclados con 3 mL de agua desionizada y 250 µL 1N de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejándose reposar por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 750 µL de Na_2CO_3 al 20% y 950 µL de agua desionizada. La mezcla se agitó, permitiendo reposar durante 30. Finalmente, se determinó la absorbancia a 765 nm (Espectrofotómetro Thermo Scientific G10S UV-Vis). El total de compuestos fenólicos fue calculado usando una curva estándar de ácido gálico y expresado como mg por gramo de peso seco de chile.

Flavonoides totales. 1 mL de extracto fue mezclado con 4 mL de agua desionizada y 300 µL de 5% de $NaNO_2$, permitiéndose reposar por cinco minutos. Entonces se agregaron 300 µL al 10% de $AlCl_3$, dejándose reposar durante un minuto. Posteriormente se añadió 2 mL 1M de NaOH y 2.4 mL de agua desionizada. La preparación fue mezclada vigorosamente, determinando la absorbancia a 415 nm (espectrofotómetro Thermo Scientific G10S UV-Vis). El total de flavonoides fue expresado como mg de equivalentes de quercetina por gramo de peso seco de chile.

Capsaicinoides totales. Se procedió de acuerdo a [2] para lo cual fue necesario realizar extracciones utilizando muestras liofilizadas. Extracción de capsaicina. 100 mg de muestra seca fueron mezclados con 25 ml de acetonitrilo calentándose en baño María a 80 °C por cuatro horas, agitándose cada 30 minutos. El sobrenadante fue filtrado en membranas Millipore de 0.2 µm. La absorbancia fue determinada a 280

nm (espectrofotómetro UV/VIS Jenway modelo 6715). Los capsaicinoides fueron determinados en mg/L (ppm) de capsaicina utilizando una curva estándar de capsaicina. La concentración de capsaicinoides totales fue expresada en mg/g de peso seco de chile y grados Scoville.

Análisis Estadístico. Con el fin de evaluar el efecto de tiempo y temperatura sobre los parámetros fisicoquímicos y fitocompuestos los resultados obtenidos fueron analizados con la ayuda del software

estadístico Statgraphics^{MR} Centurion, utilizando ANOVA y la prueba de comparación de medias mediante LSD ($p<0.05$). Cada tratamiento fue realizado por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis físico-químico del chile

Humedad, pH, acidez y °Brix. Las características de calidad del chile se encuentran ligadas a sus parámetros fisicoquímicos. En la tabla 1 se muestran los resultados relacionados con la humedad, pH, acidez y contenido de sólidos para el chile piquín entero durante los nueve días de almacenamiento tanto a 4 como 35 °C. Los resultados arrojaron que el tiempo de almacenamiento pero no la temperatura tuvo un efecto significativo ($P<0.05$) en la humedad, presentando en los primeros cinco días 74%, misma que tendió a incrementarse 2-3% a partir de los siete días de almacenamiento. El incremento fue similar al reportado por [7] para chile habanero fresco almacenado en atmósferas modificadas a 10 y 28 °C, y se ha relacionado con un incremento en la actividad de agua debido a la formación de una película externa sobre el fruto.

Tabla1. Parámetros fisicoquímicos determinados en chile piquín entero durante su almacenamiento.

Temperatura	Día	Humedad (%)	pH	Acidez* (%)	°Brix
4°C	0	73.06±2.21a	4.87±0.10a	0.17±0.00a,c	5.00±0.00c
	1	76.35±0.22a	5.11±0.02b	0.16±0.01a,b	4.40±0.00a,b
	3	74.79±0.85a	5.11±0.00b	0.17±0.00b,c	4.70±0.07b,c
	5	73.78±1.29a	5.12±0.07b	0.16±0.01b,c	4.45±0.07a,b
	7	76.47±1.46b	5.15±0.04c	0.12±0.02a,b	4.05±0.07a
	9	77.41±0.05b	5.16±0.03c	0.11±0.04a	4.10±0.14a,b
35°C	0	74.38±0.79A	4.95±0.01A	0.17±0.00B	5.00±0.00C
	1	73.56±0.27A	5.16±0.01B	0.19±0.04B	4.20±0.28A
	3	74.07±1.61A	5.22±0.04B	0.18±0.02B	5.00±0.00 C
	5	74.32±1.41A	5.12±0.04B	0.15±0.02B	4.50±0.00B
	7	76.54±0.13B	5.41±0.12C	0.16±0.01B	4.10±0.00A
	9	76.15±1.63B	5.56±0.10C	0.10±0.00A	4.15±0.07A

Letras diferentes en la misma columna para cada temperatura denotan diferencia estadística significativa ($p<0.05$). * Expresada como ácido cítrico.

Tanto el tiempo como la temperatura de almacenamiento tuvieron efecto significativo ($P<0.05$) sobre el pH, particularmente después del quinto día, incrementándose hasta 5.16 y 5.56 para 4 y 35°C respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por [5] en chile rojo procesado a 50 °C,

pero menores a los reportados en chiltepín verde procesado a 85 °C por [8]. Es posible que este resultado este directamente relacionado con la disminución ($P<0.05$) de la acidez que presentó el fruto principalmente a 35 °C, siendo de 0.17 a 0.10 % al inicio y a los nueve días de almacenamiento respectivamente, y concuerda con los cambios metabólicos de los ácidos orgánicos durante el proceso de respiración en el almacenamiento en chiles dulces [9]. Los sólidos solubles no se modificaron por efecto de la temperatura, pero si por efecto del tiempo del almacenamiento ($P<0.05$), disminuyendo ligeramente entre un 0.8 y 0.9 % en ambas temperaturas al final del almacenamiento con respecto al contenido inicial. Estos resultados difieren a los reportados por [9] en donde chiles dulces almacenados durante nueve días a 25 °C incrementaron el total de sólidos solubles asociados al cambio de carbohidratos complejos a azúcares. Es posible que esta disminución de sólidos solubles en chile piquín se deba a la lixiviación de los mismos en el agua superficial que se formó en el fruto almacenado.

Color

Los cambios de color de frutas y verduras durante el procesamiento y almacenamiento son de vital interés para la Industria ya que constituye un parámetro de calidad fundamental para el consumidor. El color puede ser medido instrumentalmente al través de la escala Hunter con los parámetros L*, a*, b * la cual se utiliza de manera común para determinar cambios en el color entre los productos frescos y procesados. Mientras el parámetro L* mide la luminosidad en una escala del 0 al 100, el parámetro +a* se relaciona con el color rojo y cuando es –a* con el verde; con respecto al parámetro +b se identifica con el color amarillo y –b* con el azul.

En la figura 2 se muestran estos tres parámetros de color para el chile piquín, pudiéndose observar una disminución ($P<0.05$) en la luminosidad del chile L* por efecto del almacenamiento a 35 °C respecto a 4 °C desde el primer día, siendo más evidente después del séptimo día. Asimismo, la variación significativa ($P<0.05$) a 35 °C de a* (-4.33 a +1.12) nos indica un cambio de color del verde a una pigmentación roja, mismo que no se presentó a 4 °C donde el producto conservó el color verde característico (valores de -3.93). En el caso del color amarillo (b*) el chile presentó esta tonalidad con cambios ligeros aunque significativos ($P<0.05$) a 4 y 35 °C en los primeros siete días de almacenamiento con un valor promedio de 31.20, para disminuir a 29.11 a los nueve días.

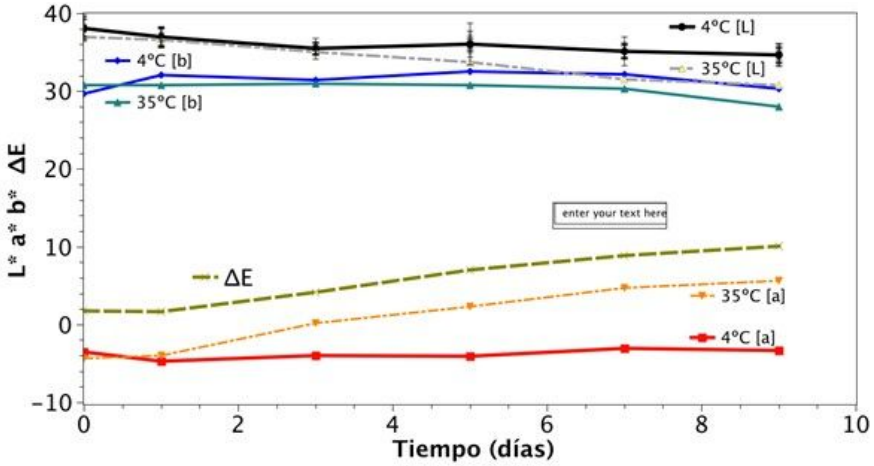


Figura 2. Perfil luminosidad (L), cambio de color (a*, verde a rojo, b*, azul a amarillo) y ΔE total, determinados en la pasta de chile a 4°C y 35°C.

El ΔE es un indicativo de cambio total de color, en donde un valor de cero, nos señala que no existe ningún cambio. Para el chile piquín el valor de AE cercano a 10 (figura 2) nos indica un evidente cambio de color del producto, relacionado en gran medida por el cambio del color verde a rojo, y la disminución de la luminosidad del producto. Los cambios en la luminosidad han sido asociados a el oscurecimiento no enzimático y reacciones de Maillard, como reportó [10] en chile rojo secado entre 50 y 90 °C; mientras los cambios de color verde en chiltepín han sido relacionados con la degradación de clorofila presente durante los procesos de escaldado y pasterizado del chile para la elaboración de salsas según reportó [8].

Determinación de fitocompuestos

Fenoles y Flavonoides totales. Los valores promedio de fenoles totales y flavonoides determinados en chile piquín se ilustran en la figura 3. Durante el almacenamiento, la temperatura tuvo un efecto significativo ($P<0.05$) en la cantidad de fenoles y flavonoides totales. La cuantificación inicial de fenoles totales y flavonoides totales (equivalente a quercetina EQ), fue de 17.75 a 19.0 mg EAG g-1 muestra BS, y 2.12 a 2.34 mg EQ g^{-1} BS, respectivamente.

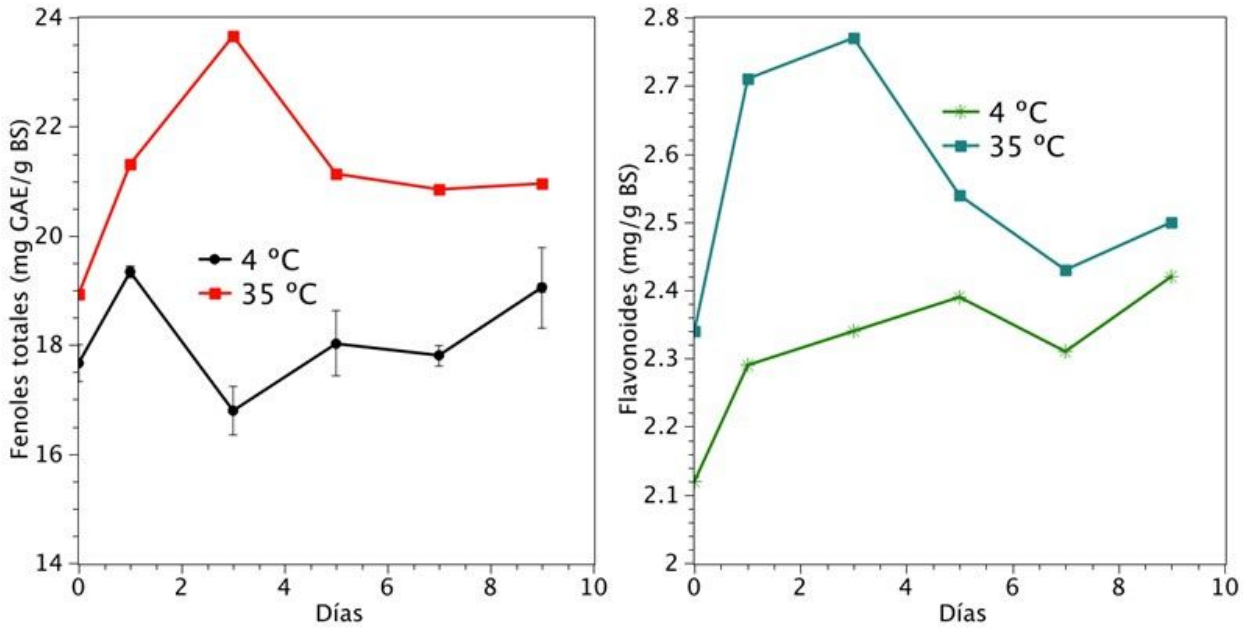


Figura 3. Perfil de compuestos fenólicos totales durante el almacenamiento, en base seca (BS) y flavonoides en pasta de chile piquín.

La concentración de fenoles y flavonoides totales representaron valores, prácticamente 8.2 y 2.2 veces mayores respectivamente que los reportados por [11]. La diferencia de resultados puede estar relacionada con la variedad, localidad del cultivo, y estación del año de las muestras de estudio. En esta investigación se evaluó *Capsicum annuum* var. aviculare, mientras que [11] no menciona la variedad de chile piquín estudiado. La variación de compuestos fenólicos durante el almacenamiento de nueve días, fue prácticamente proporcional. Excepto las muestras analizadas en el día 3 la concentración de fenoles totales a 35°C, fue prácticamente 24 mg EAG g^{-1} de muestra, mientras que a 4°C fue 16.7 mg EAG g^{-1}.

Similarmente ocurre con el monitoreo de flavonoides. La mayor concentración fue determinada en el día 3. Los resultados pueden deberse al estado de respiración fisiológica de las muestras, dependiendo de la temperatura de almacenamiento, puesto que la diferencia de fenoles totales analizados al final del almacenamiento fue 13% a 35°C con respecto a 4°C (valor inicial). Similarmente, lo anterior puede traducirse en que no siempre el almacenamiento en ambientes fríos conservan los compuestos fitoquímicos presentes en los frutos.

Capsaicinoides totales

El principal elemento en la gastronomía y cultura de México son los chiles picantes. El picor característico e intensidad depende del tipo de chile, es decir su variedad. Por lo anterior, fue monitoreado el nivel de capsaicinoides totales durante el almacenamiento de 9 días a 4ºC y 35ºC (tabla 2). Tanto el tiempo de almacenamiento como temperatura tuvieron un efecto significativo ($P<0.05$) en la concentración de capsaicinoides totales del chile piquín. Inicialmente, el contenido fue entre 25.83 mg g-1 BS y 29.96 mg g-1 BS. Este resultado puede estar relacionado con el estado de desarrollo del chile, color verde intenso (ver figura 1).

La concentración de capsaicinoides totales fue menor durante los primero tres días de almacenamiento a 4ºC, pronunciándose entre los días 5 y 7. Finalmente la concentración disminuyó levemente. El efecto de almacenamiento a 35ºC tuvo un comportamiento similar.

Tabla 2. Perfil capsaicinoides total determinada en chile piquín durante el almacenamiento

Almacenamiento	**(mg Capsaicina/ g BS)**		**Unidades Scoville[1] Log_{10}**	
Días	4°C	35°C	4°C	35°C
0	29.96 ± 4.37a	25.83 ± 1.92a	5.68 ± 4.84a	5.62 ± 4.49a
1	29.53 ± 2.39a	26.00 ± 3.47a	5.67 ± 4.58a	5.62 ± 4.74a
3	25.35 ± 0.45a	31.72 ± 3.81b	5.61 ± 3.86a	5.71 ± 4.79b
5	33.83 ± 0.96b	29.31 ± 0.37a	5.73 ± 4.18b	5.67 ± 3.77a
7	33.36 ± 0.58b	39.08 ± 1.92c	5.73 ± 3.97b	5.80 ± 4.49c
9	32.74 ± 1.88b	36.86 ± 2.59c	5.72 ± 4.48b	5.77 ± 4.62c

[1] Obtenidas a partir del producto de la concentración de capsaicinoides totales en ppm por 16 (equivalente a 1 mg de capsaicina pura). Letras diferentes en la misma columna para cada temperatura denotan diferencia estadística significativa ($p<0.05$).

La concentración de capsaicinoides aumentó progresivamente durante los primeros tres días de almacenamiento, y posteriormente decreció ligeramente. La concentración de capsaicinoides totales aumentó 23% a 35ºC con respecto a producto almacenado a 4ºC. A pesar de que el tiempo de almacenamiento no fue prolongado, pudo observarse el efecto de la temperatura de almacenamiento en ese periodo. Lo anterior concuerda con los hallazgos de [8] mencionando que a mayor estado de madurez mayor concentración de capsaicinoides totales. Argumento que también está a acorde con el desarrollo del fruto, el metabolismo enzimático, la madurez y senescencia es inversamente proporcional con la concentración de capsaicinoides en cada variedad de chile. Algunos estudios han señala una relación inversa entre la concentración de capsaicina y la actividad de peroxidasa; esto es; que cuando la concentración de capsaicinoides en chiles inmaduros es alta, la concentración de enzima es baja, mientras que cuando la concentración de enzima es alta, la concentración de capsaicinoides es baja,

produciendo principalmente ácido ferúlico y ácido cafeico [12], dos ácidos hidrocinámicos con actividad antioxidante.

La disminución de capsaicinoides podría estar reflejado en el incremento proporcional de fenoles y flavonoides, como ha sido explicado en el grafico 3.

Finalmente, en la tabla 2, se pueden observar las unidades Scoville, determinados en función de capsaicinoides totales promedio. Los valores fueron obtenidos por la multiplicación de ppm de capsaicina por 16, valor equivalente a un miligramo de capsaicina pura, reportado por Tomas et al (1998) [10].

CONCLUSIONES

El almacenamiento del chile piquín verde durante tiempos cortos a 35 °C, las cuales son temperaturas promedio en el noreste del país durante gran parte del año, incrementó la cantidad de fenoles, flavonoides y capsaicinoides totales, modificando algunas características de calidad comercial del fruto como es el color y acidez. Estos resultados indican que el chile piquín puede contribuir a la ingesta de estos fitocompuestos en la dieta. Es necesario realizar estudios complementarios de tipo sensorial que nos indiquen si los cambios fisicoquímicos que sufre el fruto a estas condiciones de almacenamiento, se traducen en cambios organolépticos para los consumidores.

REFERENCIAS

[1] É. Castellon-Martínez, J. L. Chávez-Servia, J. C. Carrillo-Rodriguez, and A. M. Vera-Guzman, "Preferencias de Consumo de Chiles (Capsicum Annuum L.) Nativos en los Valles Centrales de Oaxaca, México," *Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 35, no. ESPECIAL 5, pp. 27–35, 2012.

[2] A. González-Zamora *et al.*, "Measurement of Capsaicinoids in Chiltepin Hot Pepper: A Comparison Study between Spectrophotometric Method and High Performance Liquid Chromatography Analysis," vol. 2015, 2015.

[3] J. de J. Ornelas-Paz *et al.*, "Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers," *Food Chem.*, vol. 119, no. 4, pp. 1619–1625, 2010.

[4] J. O. Moreno-Escamilla, L. A. de la Rosa, J. A. López-Díaz, J. Rodrigo-García, J. A. Núñez-Gastélum, and E. Alvarez-Parrilla, "Effect of the smoking process and firewood type in the phytochemical content and antioxidant capacity of red Jalapeño pepper during its transformation to chipotle pepper," *Food Res. Int.*, vol. 76, pp. 654–660, 2015.

[5] A. Vega-Gálvez, R. Lemus-Mondaca, C. Bilbao-Sáinz, P. Fito, and A. Andrés, "Effect of air drying temperature on the quality of rehydrated dried red bell pepper (var. Lamuyo)," *J. Food Eng.*, vol. 85, no. 1, pp. 42–50, 2008.

[6] N. Reyes-Vázquez *et al.*, "Antioxidant constituents and chemical properties of ' Tommy atkins ' Mango grown in Campeche , México .," *Glob. Res. J. Agric. Biol. Sci.*, vol. 3, no. October, pp. 313–323, 2012.

[7] C. Gamas *et al.*, "CONSERVACION DE LA CALIDAD POSCOSECHA EN CHILE HABANERO (Capsicum," 2011.

[8] L. C. Montoya-Ballesteros, A. Gardea-Ḃejar, G. M. Ayala-Cḧavez, Y. Y. Marṫinez-Ńũnez, and L. E. Robles-Ozuna, "Capsaicinoides y color en chiltep ??in (Capsicum annuum var. aviculare). efecto del proceso sobre salsas y encurtidos," *Rev. Mex. Ing. Qum.*, vol. 9, no. 2, pp. 197–207, 2010.

[9] T. V. R. Rao, N. B. Gol, and K. K. Shah, "Effect of postharvest treatments and storage temperatures on the quality and shelf life of sweet pepper (Capsicum annum L.)," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 132, no. 1, pp. 18–26, 2011.

[10] A. Vega-Gálvez *et al.*, "Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (Capsicum annuum, L. var. Hungarian)," *Food Chem.*, vol. 117, no. 4, pp. 647–653, 2009.

[11] A. M. Vera-Guzmán, J. L. Chávez-Servia, J. C. Carrillo-Rodríguez, and M. G. López, "PHYTOCHEMICAL EVALUATION OF WILD AND CULTIVATED PEPPER (Capsicum annuum L. and C. pubescens Ruiz & Pav.) FROM OAXACA, MEXICO.," *Evaluación fitoquímica en chile (Capsicum Annu. L. C. pubescens Ruiz Pav.) Silv. y Cultiv. en Oaxaca, México.*, vol. 71, no. 4, pp. 578–585, 2011.

[12] M. Contreras-Padilla and E. M. Yahia, "Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity," *J. Agric. Food Chem*, vol. 46, no. 97, pp. 2075–2079, 1998.

EFECTO DEL PROCESO DE DESLIPIDACIÓN SOBRE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE LA SEMILLA DE AJONJOLÍ (*Sesamum indicum* L).

Tinoco-Mar, B.A., Barrera-Chávez, V.A., Padilla-de la Rosa, J.D., y Urías-Silvas, J.E.

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

*Autor para correspondencia: jurias@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El proceso de deslipidación de semillas de oleaginosas se realiza principalmente por prensado por expeler o con el uso de solventes. La semilla de ajonjolí contiene entre el 50% de aceite y 30% de proteínas y posterior a la extracción del aceite se obtiene un residuo conocido como torta de ajonjolí, el cual contiene 50% de proteína. En las semillas, las proteínas son encontradas como proteínas de reserva que tienen solubilidad diferenciada y la cual se puede ver afectada por la acción mecánica y aplicación de calor durante el prensado. Se evaluó el efecto de deslipidar la semilla de ajonjolí con n-hexano (SA) o por prensado expeler (TA), sobre las proteínas de reserva de la semilla de ajonjolí, mediante el fraccionamiento proteico, cuantificación proteica, perfil electroforético y curva de solubilidad. La fracción mayoritaria fue glutelinas ($p<0.05$), independientemente del proceso de deslipidación. En el caso de la fracción globulinas se observó una banda característica de las globulinas tipo 11S. Se obtuvo pH de máxima solubilidad diferente, para SA fue de pH 8 a 10 y para la TA de pH 10 a 12. El proceso de deslipidación mostró efectos estadísticamente significativos sobre el rango de pH de máxima solubilidad de las muestras analizadas.

Palabras clave: Deslipidación; ajonjolí; proteínas de reserva; solubilidad; electroforesis.

INTRODUCCIÓN

Las semillas son consideradas fuente importante de proteínas, las cuales se denominan proteínas de reserva debido a que aportan aminoácidos que posibilitan la germinación de la nueva plántula [1]. En la industria alimentaria, las proteínas de origen vegetal, son de gran importancia ya que poseen propiedades tecno-funcionales como capacidad de emulsión, de formación de espuma y/o geles, entre otras, que permiten su aplicación en el desarrollo y formulación de alimentos.

En base a su solubilidad, las proteínas de reserva se clasifican en cuatro grupos o fracciones: solubles en agua (albúminas), en soluciones salinas diluidas (globulinas), en mezclas de alcohol y agua (prolaminas) y en soluciones diluidas ácidas o básicas (glutelinas) [2].

Por otra parte, la semilla de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) es una oleaginosa, contiene aproximadamente 50% de aceite y 30% de proteínas. Su principal uso industrial es la producción de aceite comestible, obtenido principalmente por prensado por expeler. Posterior al proceso de prensado, se obtiene un residuo rico en proteínas (50%), denominado torta de ajonjolí (TA) [3]. Sin embargo, la TA

es considerada como no apta para consumo humano, ya que posee múltiples compuestos que disminuyen su digestibilidad y la absorción de ciertos micronutrientes como el zinc. Por ello, es utilizada como alimento para ganado y para tener acceso a esta proteína, deber ser extraída de la TA. No obstante, existen reportes donde el sobrecalentamiento y alta presión generados por el prensado de semillas, ocasionan modificaciones estructurales y de funcionalidad en las proteínas de reserva propiciando, en mayor o menor grado, la desnaturalización de éstas afectando su solubilidad y digestibilidad [4]. Existen otras técnicas que permiten deslipidar las semillas como el uso de solventes no polares. Se tiene evidencia de que el método de procesamiento afecta las proteínas obtenidas y el contenido nutricional [5; 6]. En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de deslipidar, utilizando hexano o prensado por expeler, sobre las proteínas de reserva de la semilla de ajonjolí.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

La torta de ajonjolí (TA) y la semilla de ajonjolí (SA), fueron proporcionadas por la empresa SESAJAL, S. A. de C. V.

Desengrasado

La TA se obtuvo a partir de la extracción de aceite en frío de la semilla ajonjolí por prensado por expeler y la semilla de ajonjolí (SA) fue desgrasada utilizando N-hexano (1/10 p/v) de acuerdo a Velarde-Salcedo *et al.* [7].

Fraccionamiento proteico

De acuerdo a la clasificación de Osborne [2], en base a la metodología de Barba de la Rosa *et al.* [8].

Cuantificación de proteínas

Se realizó en base al método de Bradford [9].

Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se utilizó un SDS-PAGE al 14% bajo condiciones reductoras (+ME) y no reductoras (-ME), de acuerdo a Laemmli [10].

Curva de solubilidad en función del pH

Se evaluó la solubilidad de las proteínas de TA y SA en función de pH, de acuerdo a Salcedo-Chávez *et al.* [11].

Análisis estadístico

La significancia estadística se determinó con el software Statgraphics Centurion XV mediante un análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del fraccionamiento se observó que tanto en la TA como en la SA, la fracción mayoritaria fue glutelinas ($p<0.05$), seguido de globulinas, albúminas y prolaminas. La muestra SA presentó mayor concentración de albúminas ($p<0.05$) y globulinas ($p>0.05$) que la TA (Tabla 1).

Tabla 1

Fraccionamiento proteico en base a solubilidad de la semilla de ajonjolí tras distintos tipos de desengrasado.

	Torta Ajonjolí (TA)*	**Semilla Ajonjolí (SA)***
Albúminas	1.4 ± 0.5^{bA}	5.5 ± 1.3^{bcB}
Globulinas	6.5 ± 4.8^{bA}	9.7 ± 3.0^{bA}
Prolaminas	0.4 ± 0.5^{bA}	1.1 ± 0.2^{cA}
Glutelinas	91.5 ± 5.8^{aA}	83.6 ± 4.1^{aA}

* en %. Letras minúsculas diferentes muestran significancia entre las fracciones de la misma muestra. Letras en mayúsculas muestran la significancia de las fracciones entre TA y SA ($p<0.05$)

Se ha reportado que la fracción mayoritaria de la semilla de ajonjolí son las globulinas, lo cual difiere de nuestros resultados. Lo anteriormente mencionado se puede atribuir, entre otros factores, al calor que se genera durante el proceso de prensado de la semilla, provocando a su vez, desnaturalización de las proteínas de reserva y modificación de su solubilidad. Aguilera (2014) reportó diferencias en las fracciones proteicas de pastas de ajonjolí tostadas y sin tostar, donde en pastas tostadas el porcentaje de globulinas disminuyó y el de glutelinas aumentó, en comparación a aquellas que no se les aplicó calor, un fenómeno similar fue detectado en torta de canola [6; 12; 13].

En la Figura 1 se encuentra el perfil electroforético de la TA y la SA, en condiciones desnaturalizantes con o sin agente reductor. En el carril 1 de ambos geles, en un rango de aproximadamente 13 kDa se encuentran bandas que pertenecen a la albúmina 2S de ajonjolí. Esta proteína tiene un peso molecular entre 10–15 kDa, compuesta por una cadena polipeptídica simple de dos subunidades de 9 y 4 kDa unidas por enlaces disulfuro, las cuales observamos en el carril 5 de ambos geles [1; 6].

En el carril 2 (Figura 1A y 1B) se encuentra la fracción globulinas. En el rango de 10 y 15 kDa se observan bandas que podría corresponder a la albumina 2S, debido a que en condiciones +ME (carriles 6) se encuentran dos subunidades de 9 y 4 kDa, componentes característicos de esta proteína. En esta misma condición (carril 2, Figura 1A y 1B), se observa una banda de 50 kDa representativa de una globulina 11S [1]. Las globulinas 11S confieren propiedades gelificantes y emulsificantes, además, de que su papel biológico ha sido comprobado [14].

En condiciones +ME (carril 6) se observan las subunidades ácida (30 kDa) y básica (20 kDa) características de las globulinas 11S, así como también se sigue apreciando una banda a los 50 kDa, la cual se ha reportado como globulina 7S, que prevalece en condiciones reductoras (+ME) por carecer de puentes disulfuro [15].

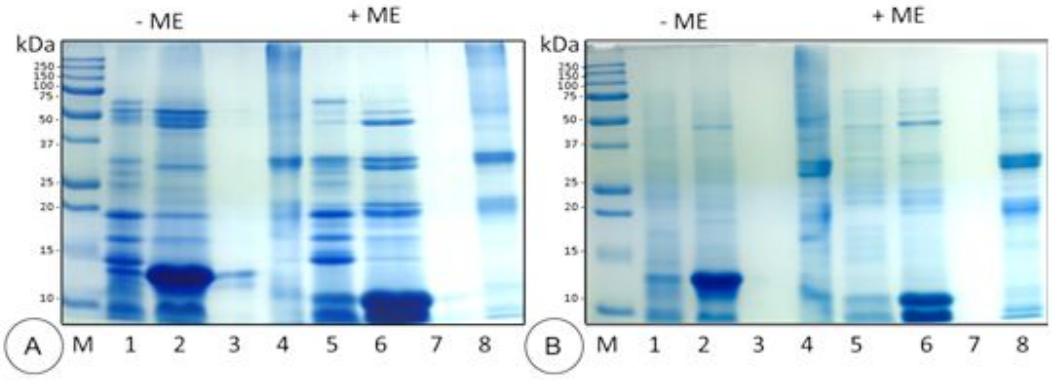


Figura 1. ***Perfil electroforético de las fracciones proteicas de semilla de ajonjolí.***

Electroforesis al 14% bajo condiciones no reductoras (-ME) y reductoras (+ME). **A:** Torta de Ajonjolí (TA); **B:** Semilla de ajonjolí extracción con hexano (SA); M: Marcador de peso molecular; Carril 1 y 5: albúminas, Carril 2 y 6: globulinas; Carril 3 y 7: prolaminas; Carril 4 y 8: glutelinas.

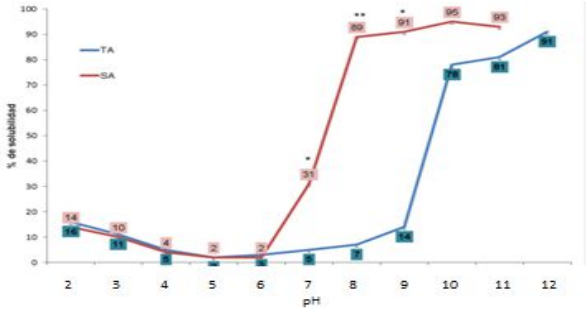


Figura 2. Curva de solubilidad de la torta de ajonjolí (TA) y semilla de ajonjolí (SA) en función al pH (Rojo Semilla de Ajonjolí extraída con N-hexano; Azul, Torta de ajonjolí obtenida del prensado por expeler). * p <0.05; ** p<0.01

Las fracciones de globulinas y glutelinas poseen solubilidad diferenciada como se mencionó previamente, sin embargo, poseen precursores proteicos similares con semejanza en tamaño y puntos isoeléctricos [16; 17], lo cual pudiera explicar la presencia de bandas de 30 y 20 kDa observadas tanto en globulinas como en glutelinas bajo condiciones +ME.

En la Figura 2, se observa la curva de solubilidad de la TA y SA. El punto isoeléctrico (pI) de la semilla de ajonjolí, independientemente del proceso de deslipidación, fue de aproximadamente 5. A pH por encima o por debajo del pI, la solubilidad de la TA y la SA se incrementó. Este fenómeno ha sido reportado para otras semillas como amaranto y soya, por mencionar algunas [12; 18; 19; 20]. Tanto la TA como la SA, mostraron mayor solubilidad en condiciones alcalinas.

Por otro lado, el punto de máxima solubilidad de la TA fue a pH 12, diferente a la SA (pH 9, $p<0.05$). Estas condiciones de solubilidad para la semilla de ajonjolí ya han sido reportadas [18]. Sin embargo, se observó diferencia en el porcentaje de solubilidad entre la TA y la SA a pH 7 ($p<0.05$), pH 8 ($p<0.01$) y pH 9 ($p<0.05$). La SA mostró mejor solubilidad que la TA a pH´s alcalinos ($p<0.05$). Las variaciones en solubilidad entre la SA y la TA, pueden ser resultado de la formación de agregados de proteínas desnaturalizadas causados por proceso de prensado.

CONCLUSIONES

El proceso de deslipidación por prensado modificó la solubilidad de las proteínas de reserva, en comparación a la extracción con solvente, lo cual se puede atribuir al calor y la fricción generados

durante dicho proceso. La mayor proporción de proteína soluble obtenida en la TA fue a pH 12 (91%) y en la SA fue a pH 9 (98%). Sin embargo, la extracción de proteína en condiciones altamente alcalinas (>pH 10) como sería el caso de la TA, podría a su vez favorecer la extracción de compuestos fenólicos que se ha reportado interaccionan con las proteínas afectando su digestibilidad. Es por ello, que el tratamiento térmico al que fue expuesta la TA durante el proceso de deslipidado podría afectar su rendimiento-digestibilidad.

REFERENCIAS

[1] S. Tai, L. Wu, E. Chen, and J. Tzen, "Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage Proteins in Sesame," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, pp. 4932–4938, 1999.

[2] T. Osborne, *Vegetable proteins*, 2da ed. 1924.

[3] E. Onsaard, "Sesame proteins," *Int. Food Res. J.*, vol. 19, no. 4, pp. 1287–1295, 2012.

[4] R. Hurrell, "Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods," in *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*, P. A. Finot, H. U. Aeschbacher, R. Hurrell, and R. Liardon, Eds. Advances in Life Sciences, 1990, pp. 245–258.

[5] R. Yasothai, "Chemical Composition of Sesame Oil Cake – Review," vol. 3, no. 3, pp. 827–835, 2014.

[6] E. Orruño and M. R. A. Morgan, "Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes," *Food Chem.*, vol. 128, no. 4, pp. 923–929, Oct. 2011.

[7] A. J. Velarde-Salcedo, A. Barrera-Pacheco, S. Lara-González, G. M. Montero-Morán, A. Díaz-Gois, E. González de Mejia, and A. P. Barba de la Rosa, "*in vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins.," *Food Chem.*, vol. 136, no. 2, pp. 758–64, Jan. 2013.

[8] A. P. Barba de la Rosa, J. Gueguen, O. Paredes-Lopez, and G. Viroben, "Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 40, no. 6, pp. 931–936, Jun. 1992.

[9] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976.

[10] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.

[11] B. Salcedo-Chávez, J. A. Osuna-Castro, F. Guevara-Lara, J. Domínguez-Domínguez, and O. Paredes-López, "Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 22, pp. 6515–6520, 2002.

[12] S. H. Tan, R. J. Mailer, C. L. Blanchard, and S. O. Agboola, "Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties," *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 1, 2011.

[13] B. A. Aguilera, "Pasta de ajonjolí (*Sesamum indicum*) un alimento proteico para cerdos y lechones recién destetados con base a sus características químicas y a la respuesta fisiológica del aparato digestivo," Universidad Autonoma de Queretaro, 2014.

[14] M. R. Sandoval-Oliveros and O. Paredes-López, "Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 193–201, 2013.

[15] K. Beyer, L. Bardina, G. Grishina, and H. Sampson, "Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: Seed storage proteins as common food

allergens," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 110, no. 1, pp. 154–159, 2002.

[16] A. V. Quiroga, L. Abugoch, M. C. Fantozzi, E. Martinez, and M. C. Añon, "Estudio comparativo de dos fracciones de amaranto," *Proteínas Aliment. y coloides interés Ind.*, pp. 223–230, 2003.

[17] C. Pickardt, G. M. Weisz, P. Eisner, D. Kammerer, S. Neidhart, and R. Carle, "Processing of low polyphenol protein isolates from residues of sunflower seed oil production," *Procedia Food Sci.*, vol. 1, no. ICEF 11, pp. 1417–1424, 2011.

[18] A. Biswas, P. Dhar, and S. Ghosh, "Antihyperlipidemic Effect of Sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate in rats fed a normal and high cholesterol diet," *J. Food Sci.*, vol. 75, no. 9, 2010.

[19] P. J. Kanu, Z. Kerui, Z. H. Ming, Q. Haifeng, J. B. Kanu, and Z. Kexue, "Sesame Protein 11: Functional properties of sesame *(Sesamum indicum L.*) Protein isolate as influenced by ph, temperature, time and ratio of flour to water during its production," *Asian J. Biochem.*, vol. 2, no. 5, pp. 289–301, May 2007.

[20] U. D. Chavan, D. B. McKenzie, and F. Shahidi, "Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.)," *Food Chem.*, vol. 74, no. 2, pp. 177–187, 2001.

DESARROLLO DE EMULSIONES DE ACEITE DE CAFÉ VERDE (*Coffea arabica*) POR ULTRASONICACIÓN.

[1]Barajas-Álvarez, P., [2]Haro-González, J.N., [2*]Espinosa-Andrews, H., y [1]Arriola-Guevara, E.

1. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Boulevard Marcelino García Barragán No. 1421, Guadalajara, Jalisco, México 44430.
2. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Unidad de Tecnología Alimentaria, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México 45019.

*Autor para correspondencia: hespinosa@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
Las emulsiones consisten en dos líquidos inmiscibles, que para su formación es necesario el uso de energía como la ultrasonicación. Las emulsiones que contienen compuestos de interés han sido utilizadas para la generación de nuevos productos para diversas áreas de la industria. El aceite de café verde posee, compuestos antioxidantes de la familia del ácido clorogénico. En este trabajo se desarrollaron emulsiones de aceite de café verde utilizando el método de ultrasonicación con la finalidad de estudiar el efecto del tiempo de sonicación y la proporción de aceite y goma arábiga sobre el tamaño de partícula, estabilidad física e índice de polidispersidad, utilizando un diseño 2^2. Los efectos estadísticamente significativos ($p<0.05$) para el tamaño de partícula fueron el tiempo de sonicación, la proporción de aceite:goma y la interacción entre ambos. Mientras que para el índice de polidispersidad fue el tiempo de sonicación. Los resultados revelaron que las emulsiones con menor tamaño de partícula y mayor estabilidad física fueron aquellas con un tiempo de sonicación de 25 min y proporción aceite:goma de 1:3 obteniendo tamaños de 554.6 nm.

Palabras clave: Aceite de café verde; emulsiones; ultrasonicación.

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones consisten en dos líquidos inmiscibles, comúnmente agua y aceite, uno de ellos disperso en el otro en forma de pequeñas gotas esféricas. Pueden clasificarse de acuerdo a la distribución de las fases acuosa y oleosa, como emulsiones aceite en agua y agua en aceite [1]. Son sistemas termodinámicamente inestables, por lo que para su formación es necesario el uso de métodos de alta energía para provocar la ruptura de partículas. Los métodos de emulsionantes de alta energía comúnmente empleados son homogeneización, ultrasonicación o microfluidización. El ultrasonido se define como ondas de sonido con frecuencias fuera del alcance del oído humano. La cavitación es el proceso que gobierna en la formación de emulsiones; presenta ventajas por su bajo costo, fácil manipulación y mejor control sobre las variables de formulación [2].

En los últimos años, el aceite de café verde ha tenido gran impacto debido a su composición única, además reportes en la literatura muestran la capacidad antioxidante y quimioprotectora [3]. Los efectos benéficos que tiene el aceite de café se han atribuido a la presencia de compuestos fenólicos con capacidades antioxidantes, principalmente a los ácidos clorogénicos [4]. Sin embargo, la presencia de

ácidos grasos insaturados y compuestos antioxidantes en el aceite de café verde lo hace susceptible, dando como consecuencia la disminución de sus propiedades y valor nutricional junto con la producción de olores y sabores indeseables [5], [6]. Por lo que, la encapsulación ha sido una alternativa para evitar el proceso de degradación. El objetivo de este trabajo fue desarrollar emulsiones de aceite de café verde utilizando el método de ultrasonicación. Además de estudiar el efecto del tiempo de sonicación y la proporción de aceite y goma arábiga sobre el tamaño de partícula, estabilidad física e índice de polidispersidad, utilizando un diseño 2^2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó goma arábiga de lágrima como agente emulgente. Esta fue triturada y posteriormente disuelta en agua destilada a una concentración de 20%. La solución se preparó un día antes de ser utilizada y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 12 h para asegurar la completa hidratación del biopolímero [7].

El aceite de café verde extraído fue utilizado para la generación de emulsiones. Las emulsiones fueron preparadas por cavitación empleando un ultrasonicador (Fisher Scientific, EUA, modelo FB-50 de 50 Watts) utilizando una punta de 1/8" (13.8 cm L x 1.3 cm D) y una amplitud de 90%. La temperatura fue controlada circulando continuamente agua a 30 °C a través de una chaqueta. Se utilizó un diseño 2^2 con dos replicas variando la proporción de aceite de café verde:goma arábiga (p:p) y el tiempo de emulsión como se muestra en la Tabla 1, las variables de respuesta fueron tamaño de partícula, índice de polidispersidad y estabilidad física. Para cada una de las corridas se preparó una pre-emulsión utilizando un dispersor de alto corte Ultra-Turrax T 25 basic (IKA-WERKE, Alemania) a 13,500 rpm durante 5 minutos con un volumen total aproximado de 20 mL [7], [8]. Los resultados fueron analizados utilizando el software Statgraphics Centurion XVI©. Los efectos de las variables independientes sobre las variables de respuesta fueron evaluados utilizando un nivel de confianza del 95% para todas las variables.

Tabla 1: Diseño de experimentos para formulación de las emulsiones de aceite de café verde

Nivel / Factor	Bajo (-1)	Alto (+1)
Proporción aceite de café verde: goma arábiga (p:p)	1:1	1:3
Tiempo de sonicación (min)	5	20

Tamaño de partícula e índice de polidispersidad

El tamaño de partícula e índice de polidispersidad de las emulsiones se determinó utilizando un dispersor de luz dinámica Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern, Reino Unido) midiendo el movimiento Browniano de las partículas convirtiéndolo a un valor de tamaño y distribución. Se realizó una dilución 1:100 de cada una de las emulsiones, y posteriormente, se colocó la muestra en una celda y se introdujo al equipo, se seleccionó la medición de tamaño de partícula y se registraron los valores, cada una de las mediciones se hicieron por triplicado.

Estabilidad física de la emulsión

La estabilidad de la emulsión se calculó mediante el índice de cremado. Inmediatamente después de preparar la emulsión se almacenó a temperatura ambiente (20±3 °C) y transcurridas 24 h se midió la

longitud de la fase superior (L_1) y la longitud de la emulsión inicial (L_0) como se muestra en la siguiente ecuación. Posteriormente se midió en los días 3, 5 y 15.

$$Índice\ de\ cremado\ \% = \frac{L_1}{L_0} \times 100$$

Esta medición proporciona información indirecta sobre la agregación de las gotas en la emulsión, en general, mayor agregación tiene como consecuencia un índice de cremado más rápido [9].

Microscopía óptica de la emulsión

La microscopía óptica de las emulsiones se realizó justo después de su preparación, con el objetivo de observar las gotas de la emulsión. Se colocó una gota de emulsión sobre un portaobjetos y posteriormente se le sobrepuso un cubreobjetos. Se utilizó un microscopio Lieder MC110 (Lieder Microscopes, EUA) con el objetivo 100X utilizando una gota de aceite de inmersión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tamaño de partícula e índice de polidispersidad

El tamaño e índice de polidispersidad de las emulsiones obtenidas en el diseño de experimento se muestra en la Figura 1. El tamaño de las pre-emulsiones de goma arábiga con las relaciones 1:1 y 1:3 (ACV:GA) fue de 1.32±0.15 µm y 1.72±0.22 µm respectivamente. Estas pre-emulsiones fueron sometidas a un proceso de ultrasonicación la cual produjo un colapso de las gotas dando como resultado la disminución de los glóbulos de la emulsión [2].

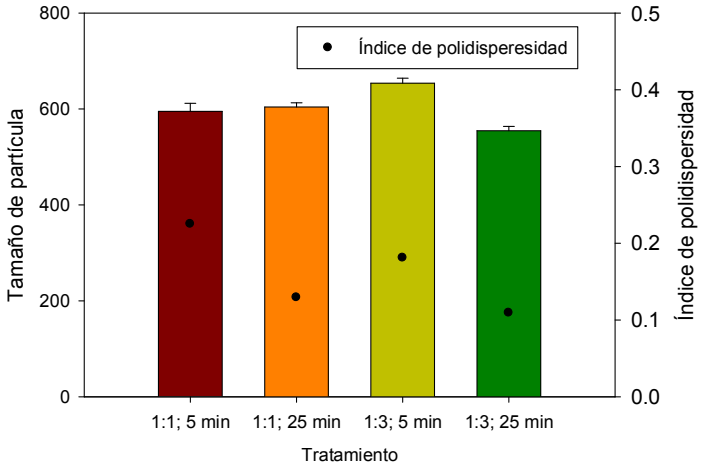


Figura 1: Tamaños de partícula e índices de polidispersidad obtenidos para las emulsiones de goma arábiga a diferentes tiempos y relación de ACV:GA.

Los datos obtenidos muestran que a baja relación ACV:GA (1:1) se obtuvieron emulsiones con un tamaño de partícula de entre 595.1 y 604.2 nm y, mientras que para la relación ACV:GA (1:3) el tamaño de partícula varió entre 554.6 y 653.9 nm. Las emulsiones se vieron afectadas tanto por la relación de aceite de café verde:goma arábiga, como por el tiempo de sonicación. En ambas relaciones, el tamaño fue disminuyendo con el aumento del tiempo debido a la energía suministrada promovió la ruptura de los glóbulos de la emulsión.

El índice de polidispersidad (IPD) es una manera de representar como están distribuidas las partículas en una emulsión, esto es la fracción de partículas dentro de un rango de tamaños diferentes. Es el grado de polidispersidad en la distribución de los tamaños de partícula de la emulsión, lo que implica un proceso uniforme y consistente [10], [11]. Todos los valores de IPD de las emulsiones generadas se encuentran por debajo de 0.3, en general este valor disminuye al aumentarse tanto la cantidad de goma arábiga y como el tiempo de ultrasonicación (Figura 1), lo que indica un efectivo proceso de homogeneización para formar un sistema uniforme [12]. Todas las emulsiones mostraron una distribución mono-modal, lo cual indica uniformidad en la distribución de los tamaños de partícula, lo cual puede indicar que se trata de una emulsión estable [12]. Estos resultados muestran que la ultrasonicación es un método adecuado para la generación de emulsiones de aceite de café verde.

El análisis estadístico para el tamaño de las partículas de emulsión indicó que las variables significativas ($p<0.05$) para el diseño propuesto fueron el tiempo de sonicación (B), la interacción entre el tiempo de sonicación y la proporción de ACV:GA (AB). Los cuales tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta, es decir que, al aumentar el tiempo de sonicación se obtendrán menores tamaños de partícula. La proporción de ACV:GA también presentó un efecto estadísticamente significativo, sin embargo, tiene un efecto positivo en el tamaño de partícula de la emulsión como se puede observar en la Figura 2.

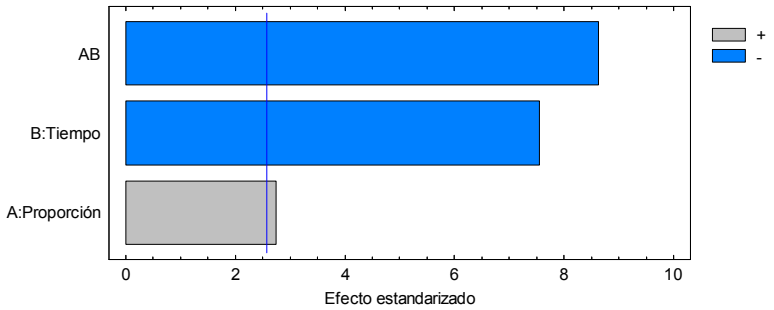


Figura 2: Diagrama de Pareto para el tamaño de la emulsión

El análisis estadístico para el índice de polidispersidad de las emulsiones de aceite de café verde con goma arábiga muestran que el efecto estadísticamente significativo ($p<0.05$) para el diseño propuesto fue el tiempo de sonicación, el cual, como se puede ver en el diagrama de Pareto de la Figura 3, tiene un efecto negativo, es decir, a mayor tiempo de sonicación se obtendrán menores índices de polidispersidad.

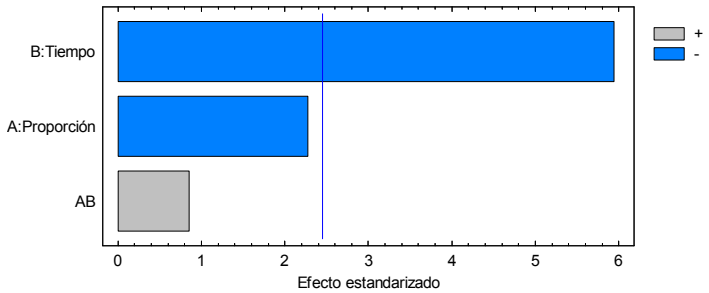


Figura 3: Diagrama de Pareto para el índice de polidispersidad de emulsiones.

El efecto negativo de la proporción de ACV:GA sobre el tamaño de partícula de la emulsión puede deberse a habilidad de formar películas protectoras alrededor de las gotas de la emulsión, es decir, la adición de una mayor cantidad de goma arábiga en la emulsión hace posible un mejor recubrimiento de la superficie de las gotas de aceite de café verde dispersas, inhibiendo la agregación de gotas gracias a las repulsiones electroestáticas y estéricas, dando como resultado la formación de un mayor número de partícula de menor tamaño con una distribución de tamaños más estrechas [13]. Esto coincide con lo obtenido por Gharibzahedi y colaboradores (2013) [13] para emulsiones de cantaxantina con goma arábica y xantana y con lo descrito por Bai y colaboradores (2017) [14] para emulsiones de aceite de maíz con pectina de remolacha y goma arábiga y de fibra de maíz. Para ambos casos, un incremento en la concentración de surfactante ocasiona una disminución en el tamaño de partícula de la emulsión.

El tiempo de sonicación indicó el tiempo de residencia de la emulsión bajo condiciones extremas de turbulencia del campo acústico [15]. A tiempos de sonicación largos (25 min) se logra un tamaño de partícula y un IPD menores. Un incremento en el tiempo resulta en una mayor cantidad de energía disponible para la ruptura de las gotitas de emulsión, disminuyendo así el tamaño y el IPD [2]. Silva y colaboradores (2015) [11] obtuvieron el mismo comportamiento para emulsiones de aceite de achiote utilizando goma arábiga como material encapsulante, incrementando el tiempo de sonicación de 0.5 a 5 min lograron disminuir tanto el tamaño de partícula de las emulsiones de 1.5 µm a 690 nm así como el IPD. De igual manera Carpenter y Saharan (2017) [15] observaron una disminución en el tamaño de partícula cuando se incrementa el tiempo de sonicación para emulsiones de aceite de mostaza utilizando Tween 80 y Span 80.

Estabilidad física

Las pre-emulsiones de aceite de café para ambas formulaciones de ACV:GA presentaron una separación de fases a las pocas horas de su preparación (Figura 4a), debido a que su gran tamaño de partícula incrementó su desestabilización física. Por otro lado, las emulsiones generadas con el proceso de ultrasonicación (Figura 4b) fueron desestabilizándose conforme pasaban los días (Figura 4c) mostrando un aumento en el índice de cremado.

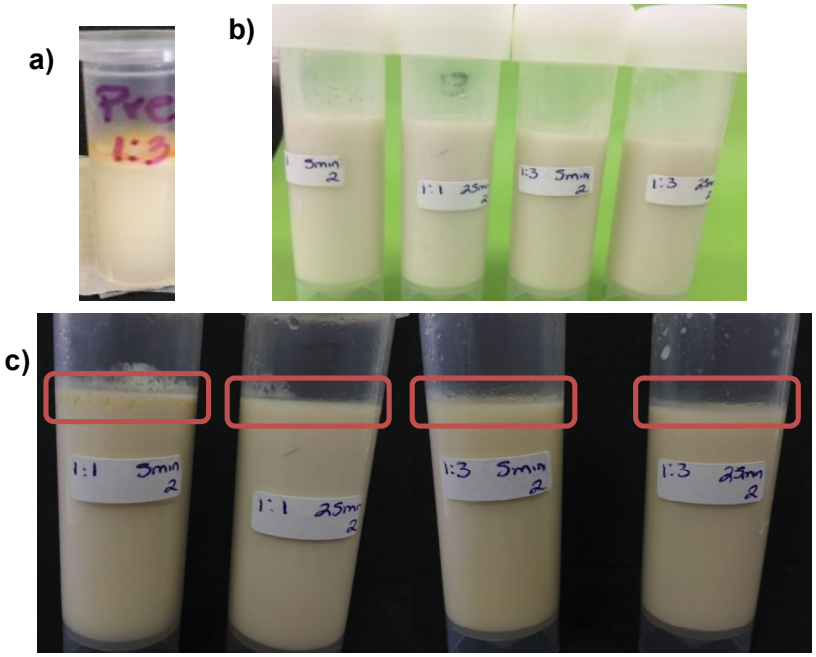


Figura 4: Estabilización de emulsiones de ACV:GA: a) pre-emulsión 1:3 ACV:GA; b) Emulsiones de ACV:GA generadas por ultrasonicación día 0; c) Emulsiones de ACV:GA generadas por ultrasonicación día 15.

El índice de cremado da información indirecta sobre el grado de agregación de las gotas en la emulsión. Entre mayor sea la agregación, más grande será el tamaño efectivo de las gotas, y por lo tanto más rápida será la formación del cremado [11]. Los resultados del índice de cremado se muestran en la Figura 5, como se puede observar todas las emulsiones sufrieron una inestabilidad física y formaron en la parte superior una capa de cremado, en algunas emulsiones es posible observar pequeñas gotas de aceite. Sin embargo, algunas emulsiones fueron más estables que otras a lo largo del tiempo de almacenamiento. Las emulsiones con proporción 1:1 ACV:GA y 5 minutos de sonicación mostraron índice de cremado de 1% desde el primer día de almacenamiento, incrementando hasta 9% a través de su almacenamiento. Mientras que las emulsiones con una proporción de 1:3 ACV:GA y 25 minutos de sonicación fueron las más estables a lo largo del tiempo de almacenamiento.

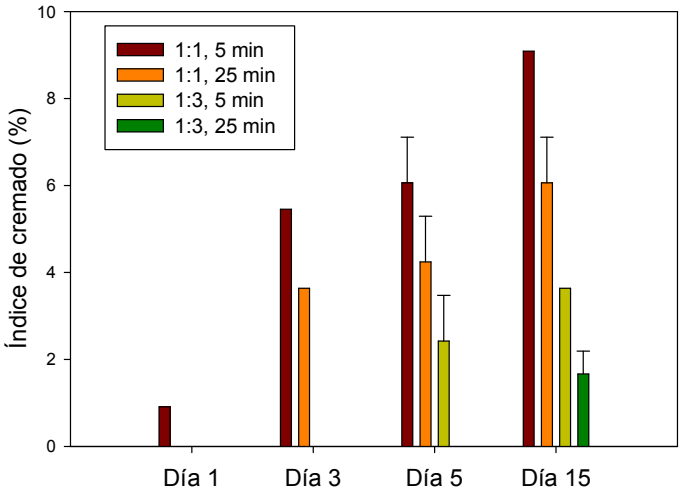


Figura 5: Efecto del tratamiento de ultrasonicación (proporción de ACV:GA y tiempo) sobre el índice de cremado de las emulsiones para distintos tiempos de almacenamiento.

Se puede concluir que, reducir el tamaño de partículas en la emulsión promueve su estabilización cinética. Este efecto se ve claramente al comparar los tamaños de partícula de las emulsiones y la estabilidad física de las emulsiones.

Microscopía óptica de la emulsión

En la Figura 6 se muestran las imágenes observadas en un microscopio óptico, en las cuales se puede apreciar las formas esféricas que presentan las emulsiones en los tratamientos aplicados y la manera de cómo se encuentran distribuidas. Las microfotografías corroboran los resultados obtenidos y reportados anteriormente (Figura 1) para tamaños y distribución de partícula. Se observa el efecto antes descrito, a mayores tiempos de ultrasonicación se obtienen tamaños de partícula menores y una distribución uniforme de ellas.

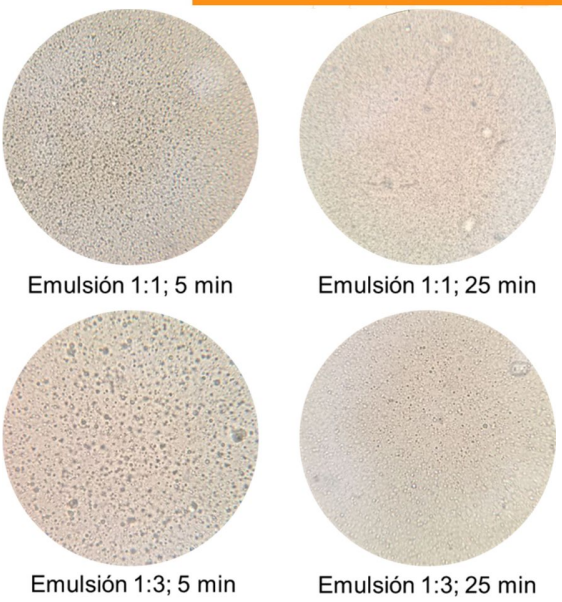


Figura 6: Micrografías ópticas de las emulsiones de aceite de café verde obtenidas por ultrasonicación.

CONCLUSIONES

La emulsificación por ultrasonicación es un método adecuado para la formación de emulsiones físicamente estables de aceite de café verde utilizando goma arábiga como material encapsulante, logrando tamaños de partícula e índices de polidispersidad bajos con el aumento del tiempo de sonicación.

La formulación de 1 g de aceite por 3 g de goma arábica fue la que presentó menores tamaños de partícula y mejor estabilidad física, esto debido a que una mayor cantidad de material encapsulante recubre de mejor manera la superficie de las gotas de aceite dispersas e inhibe la agregación de las gotas lo que ayuda a tener una mejor estabilidad física.

La posible aplicación de las emulsiones de aceite de café verde es para industrias cosméticas o de alimentos debido a las propiedades antioxidantes del aceite.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACyT por el financiamiento de este trabajo a través del convenio CB-2015-01/258118.

REFERENCIAS

[1] P. N. Ezhilarasi, P. Karthik, N. Chhanwal, and C. Anandharamakrishnan, "Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 3, pp. 628–647, 2013.

[2] S. Abbas, K. Hayat, E. Karangwa, M. Bashari, and X. Zhang, "An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions," *Food Eng. Rev.*, vol. 5, no. 3, pp. 139–157, 2013.

[3] A. B. F. L. Nosari, J. F. Lima, O. A. Serra, and L. A. P. Freitas, "Improved green coffee oil

antioxidant activity for cosmetical purpose by spray drying microencapsulation," *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 25, no. 3, pp. 307–311, 2015.

[4] M. Jeszka-Skowron, E. Stanisz, and M. P. De Peña, "Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 243–250, 2016.

[5] E. C. Frascareli, V. M. Silva, R. V. Tonon, and M. D. Hubinger, "Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying," *Food Bioprod. Process.*, vol. 90, no. 3, pp. 413–424, 2012.

[6] J. Rodríguez, M. J. Martín, M. A. Ruiz, and B. Clares, "Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives," *Food Res. Int.*, vol. 83, pp. 41–59, 2016.

[7] R. V. de B. Fernandes, S. V. Borges, E. K. Silva, Y. F. da Silva, H. J. B. de Souza, E. L. do Carmo, C. R. de Oliveira, M. I. Yoshida, and D. A. Botrel, "Study of ultrasound-assisted emulsions on microencapsulation of ginger essential oil by spray drying," *Ind. Crops Prod.*, vol. 94, pp. 413–423, 2016.

[8] S. Kentish, T. J. Wooster, M. Ashokkumar, S. Balachandran, R. Mawson, and L. Simons, "The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 9, no. 2, pp. 170–175, 2008.

[9] V. N. Lad and Z. V. P. Murthy, "Enhancing the stability of oil-in-water emulsions emulsified by coconut milk protein with the application of acoustic cavitation," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, no. 11, pp. 4222–4229, 2012.

[10] D. J. McClements and J. Rao, "Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity.," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 51, no. 4, pp. 285–330, 2011.

[11] E. K. Silva, M. T. M. S. Gomes, M. D. Hubinger, R. L. Cunha, and M. A. A. Meireles, "Ultrasound-assisted formation of annatto seed oil emulsions stabilized by biopolymers," *Food Hydrocoll.*, vol. 47, no. May, pp. 1–13, 2015.

[12] E. K. Silva, G. L. Zabot, and M. A. A. Meireles, "Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Retention and release of a bioactive compound with functional activities," *Food Res. Int.*, vol. 78, no. October, pp. 159–168, 2015.

[13] S. M. T. Gharibzahedi, S. H. Razavi, and S. M. Mousavi, "Ultrasound-assisted formation of the canthaxanthin emulsions stabilized by arabic and xanthan gums," *Carbohydr. Polym.*, vol. 96, no. 1, pp. 21–30, 2013.

[14] L. Bai, S. Huan, Z. Li, and D. J. Mcclements, "Comparison of emulsifying properties of food- grade polysaccharides in oil-in-water emulsions : Gum arabic , beet pectin , and corn fiber gum," *Food Hydrocoll.*, vol. 66, no. January, pp. 144–153, 2017.

[15] J. Carpenter and V. K. Saharan, "Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 35, pp. 422–430, 2017.

[16] K. D. Mahrer, "Some considerations when abstracting," *Geophysics*, vol. 58, no. 1. pp. 10–11, 1993.

[17] M. Weiss and A. M. Newman, "A guide to writing articles in energy science," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 11, pp. 3941–3948, 2011.

EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y TIPO DE INÓCULO EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL JOCOQUE.

*López-Ramírez, J., Mondragón-Cortez, P., Villanueva-Rodríguez, S., Orozco-Ávila, I., Estarrón-Espinosa, M., Chombo-Morales, P.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
Tecnología Alimentaria. Normalistas # 800, Colinas de la Normal, Guadalajara Jalisco, México, C.P. 44270.

*Autor para correspondencia: jelopez@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
El jocoque es un producto lácteo fermentado, tradicional en México, con potencial probiótico asociado al desarrollo de microorganismos, sin embargo, ha sido poco estudiado. El objetivo de esta investigación fue evaluar el impacto del tratamiento térmico y el tipo de inóculo en propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del jocoque. Se utilizaron dos tipos de inóculo, aplicados en leche cruda y en leche pasteurizada. Se realizó un análisis de varianza con los datos obtenidos. Se encontró que en los tratamientos con leche cruda el pH disminuyó de 6.9 a 4.6 y en los tratamientos con leche pasteurizada de 6.64 a 3.9. La acidez aumentó de 1.26 a 6.99 g/L de ácido láctico (valores mínimo y máximo registrados). La medición reológica, mostró que el jocoque es un gel elástico y los valores mínimo y máximo en el punto de gelación fueron 0.3018 y 11.25 Pa. Por otro lado la espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR), permitió diferenciar las bandas de absorción características en proteínas, carbohidratos y grasas de las muestras. El análisis microbiológico mostró incremento en el desarrollo de bacterias ácido-lácticas en las muestras analizadas. El análisis estadístico, mostró diferencias significativas ($P<0.005$) entre los factores tratamiento térmico y tipo de inóculo.

Palabras clave: Palabras clave: Jocoque; lácteos-fermentados; calidad; reología, FTIR.

INTRODUCCIÓN

La industria láctea es de gran valor en la producción nacional pecuaria, por su crecimiento es considerada una actividad rentable [1]. Los productos lácteos son alimentos con un alto valor nutritivo, por su aporte en carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, así como de aminoácidos esenciales y de otros micronutrientes que contribuyen a la salud de los consumidores.

Varios reportes científicos indican que la incorporación de productos lácteos en la dieta de pacientes, ayuda en el tratamiento de la osteoporosis, el colesterol, la hipertensión arterial y algunos tipos de cáncer [2]-[6]. En estos productos, se encuentran algunos compuestos que ejercen un efecto benéfico para alguna función del individuo, razón por la que pueden considerarse como alimento funcional. Ya se ha reportado la funcionalidad probiótica y prebiótica de quesos madurados o leches fermentadas, por efecto de la acción de microrganismos, que permaneces viables en productos obtenidos de la fermentación de la leche teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación.

A lo largo de la historia, la fermentación se ha utilizado para extender la vida de anaquel de la leche, la evolución de estos productos ha dependido de las habilidades culinarias de los habitantes de determinada región y del tipo microorganismos que participan en su formulación. Lo anterior ha generado una gran diversidad de productos lácteos fermentados de consumo tradicional, alrededor del mundo, en Afganistán se elabora el Doogh a partir de leche de cabra, en Asia se elabora el kumis de leche de yegua, el kéfir, en el este de Europa, principalmente, y en algunas partes del mundo se consume el yogur, de origen búlgaro, indú o iraní, que se elabora a partir de leche de vaca, en México se consume el jocoque que se produce a partir de leche de vaca.

La palabra jocoque viene del náhuatl "xococ" que quiere decir agrio [7]. Es un producto de sabor ácido con consistencia semi-pastosa de color blanco. Es un alimento rico en proteínas que debido al proceso de fermentación se vuelve más agradable al gusto y su vida de anaquel más larga [8]. La calidad y composición del jocoque, está en función del proceso de elaboración que consiste en: la obtención de la leche, la fermentación, el corte, el drenado del suero (opcional) y el envasado.

Las mediciones fisicoquímicas de pH y acidez, permiten obtener información útil sobre la calidad de la leche. El pH de la leche de vaca recién ordeñada y sana, tiene valores entre 6.5 y 6.8, como consecuencia de la presencia de caseínas, aniones fosfórico y cítrico, sin embargo, valores principalmene entre 6.9 y 7.5 se pueden encontrar en leches mastíticas [9], [10]. En las leches fermentadas el pH suele disminuir a valores cercanos a 4. La acidez normalmente presenta valores entre 1.3 y 1.7 g/L de ácido láctico y es generada por los fosfatos, caseínas y dióxido de carbono [11], generalmente se determina por análisis volumétrico, con base en la Norma Oficial NOM-155-SCFI-2012 [12]. Las leches con una baja calidad sanitaria, pueden presentar alta acidez, indicando contaminación microbiana.

La medición de propiedades reológicas permite evaluar la interacción en la formación de gel, principalmente entre caseínas y proteínas del suero por efecto de la disminución del pH. Mientras que las mediciones por FTIR, permite evaluar cambios en la composición general y la interacción molecular de las muestras.

La evaluación microbiológica permite el recuento de unidades formadoras de colonia en medios de cultivos ampliamente utilizados en la industria láctea. Man Rogosa Sharpe (MRS), para bacterias ácido lácticas. Cuenta total (CT), para recuento total y papa dextrosa (DP), para hongos y levaduras.

El jocoque es un derivado lácteo fermentado producido en diversas partes del país, normalmente para autoconsumo (a nivel casero), del cual se tiene muy poca información. Por lo que el objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto del tratamiento térmico y del inóculo en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del jocoque, bajo la hipótesis de que las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas se ven significativamente afectadas por el tratamiento térmico y por el tipo de inóculo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

La leche se obtuvo de un proveedor en la periferia de la zona metropolitana de Guadalajara, se obtuvo cruda del mismo día de ordeña. Los inóculos se obtuvieron de productores de jocoque en los Altos de Jalisco. La elaboración de la muestras se realizó de acuerdo al plan experimental que se muestra en la

Tabla1. Tomando en cuenta las recomendaciones de los productores, se dejaron reposar durante 11h, con excepción de la muestra Testigo, cuyo reposo fue de 78h.

Tabla 1. Descripción y clave de las muestras.

JOCOQUE	INÓCULO	DESCRIPCIÓN	CLAVE
CONTROL	Ninguno	Jocoque, leche sin pasteurizar, sin inóculo.	T
SIN PATEURIZAR		Leche cruda	L
	40 g/L de Inóculo 1	Jocoque con leche cruda con inóculo 1	CI
	40 g/L de Inóculo 2	Jocoque con leche cruda con inóculo 2	CIQ
PASTEURIZADA*		Leche pasteurizada	B
	40 g de Inóculo 1/L de leche	Jocoque con leche pasteurizada Inóculo 1	BI
	40 g de Inóculo 2/L de leche	Jocoque con leche pasteurizada con inóculo 2	BIQ

* Pasteurización a 60°C durante 30 minutos.

Mediciones fisicoquímicas

Determinación del pH. Se utilizó un potenciómetro de mesa modelo orion star A211, marca Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EE.UU.), para su determinación el electrodo fue sumergido en la muestra. Determinación de acidez titulable. Se determinó en base a lo especificado en la norma NOM-155-SCFI-2012 [12]. La actividad de agua se midió en un equipo Aqualab pro marca METLER Group, Inc. Pullman, WA 99163, EE. UU.

Mediciones reológicas

Para determinar las propiedades reológicas de las muestras de jocoque se utilizó un reómetro de esfuerzo controlado (Advanced Rheometer AR 1000, TA instrument, Dr, New Castle, DE 19720, EE. UU.). Se utilizó una geometría cilíndrica concéntrica (20 mL de tamaño de muestra, hueco fijo de 5920 µm, radio de 15 mm, radio exterior de rotor de 14 mm y altura de inmersión de cilindro de 42 mm) a una temperatura constante de 4° C. Las mediciones se realizaron a una deformación máxima constante del 1% y una frecuencia de 0,5 Hz. Las diferencias en las propiedades mecánicas entre las muestras se evaluaron determinando la dependencia de la frecuencia de los valores de G 'y G'', calculando la pendiente de un gráfico log / log, con base en la metodología reportada por Passeephol *et a*l. [14].

Obtención de espectros por FTIR

Se obtuvieron con un espectrofotómetro Kary 630 marca Agilent (Santa Clara, Ca, 95051 EE. UU.)

Análisis microbiológico

Se sembraron 3 diluciones en medio selectivo Man Rogosa Sharpe (MRS) para bacterias ácido lácticas, tres diluciones en medio selectivo para recuento total (CT) y las mismas tres diluciones en medio papa dextrosa (DP) para hongos y levaduras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron mediciones a las muestras de leche sin pasteurizar, leche pasteurizada y a las de jocoques elaborados a partir de estas. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

En general El pH disminuyó de 6.64 a 3.9 y de 6.69 a 4.6 en los jocoques con leche pasteurizada y sin pasteurizar, respectivamente, mientras que la acidez aumentó de 1.26 a 6.99 g/L de ácido láctico, este comportamiento ya ha sido reportado por diversos autores como característico de productos fermentados, esta propiedad forma parte de la descripción de leche fermentada del Codex Alimentario [13]. Se ha observado que la acción de microorganismos que forman ácido láctico a partir de lactosa durante el proceso de fermentación como *Streptococcus* lácticos pueden contribuir a la disminución del pH hasta 4.3, mientras que la acidez supera el 0.18% [14]. Estadísticamente, el tratamiento que presentó diferencias significativas fue el que no se le agrego inóculo con un valor de p = 0.003 para pH y p=0.002 para acidez (Figura 1). Los jocoques elaborados con el inóculo 1 presentaron valores de pH menores, sin embargo, con respecto a los jocoques elaborados con el inóculo 2, no se encontraron diferencias significativas.

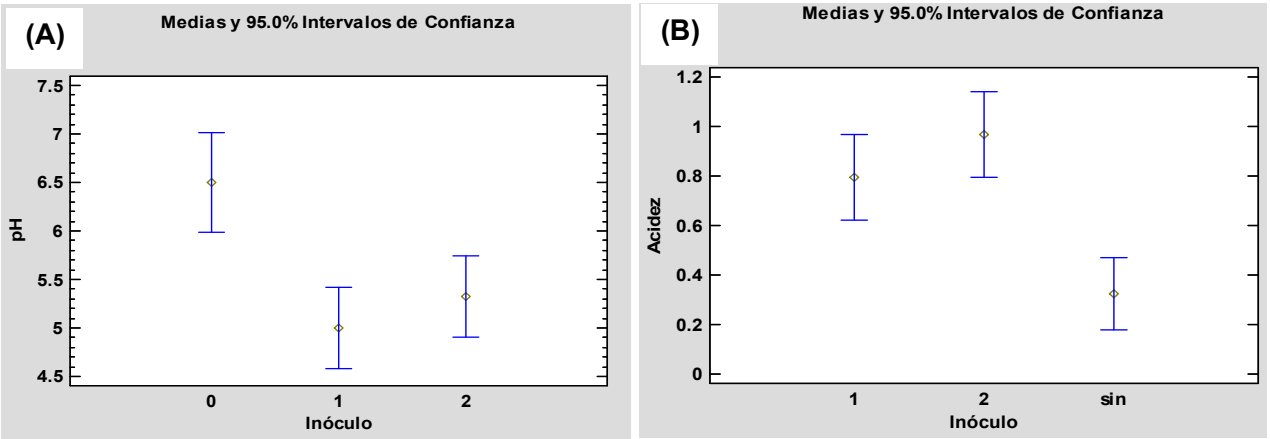


Figura 1. Gráfica de medias para pH (A) y acidez (B) por tipo de inóculo.

La medición de actividad de agua en todas las muestras presentó valores por arriba de 0.95. Se encontraron diferencias significativas (valor P = 0.000), respecto al tratamiento (Figura 2), efecto que no se observó respecto al tipo de inóculo.

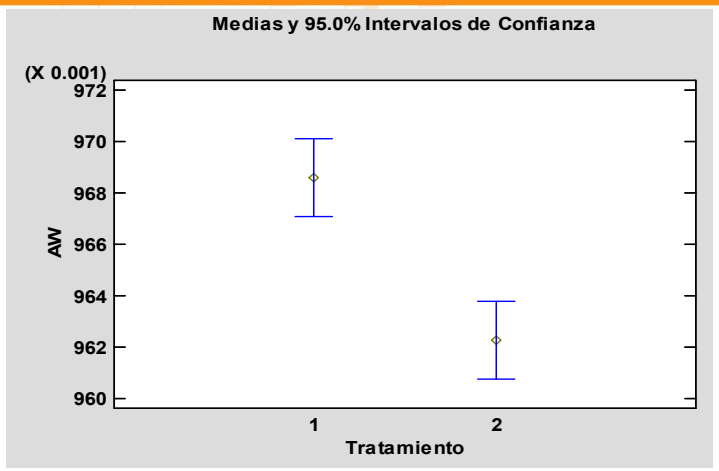


Figura 2. Gráfica de medias para Actividad de agua y tratamiento térmico.

Los jocoques presentaron diferencias significativa respecto al comportamiento reológico según la tratamiento (p=0.000) y tipo de inóculo (Valor P=0.000) que puede atribuirse a fenómenos estructurales. Este comportamiento coincide con reportes de yogures.

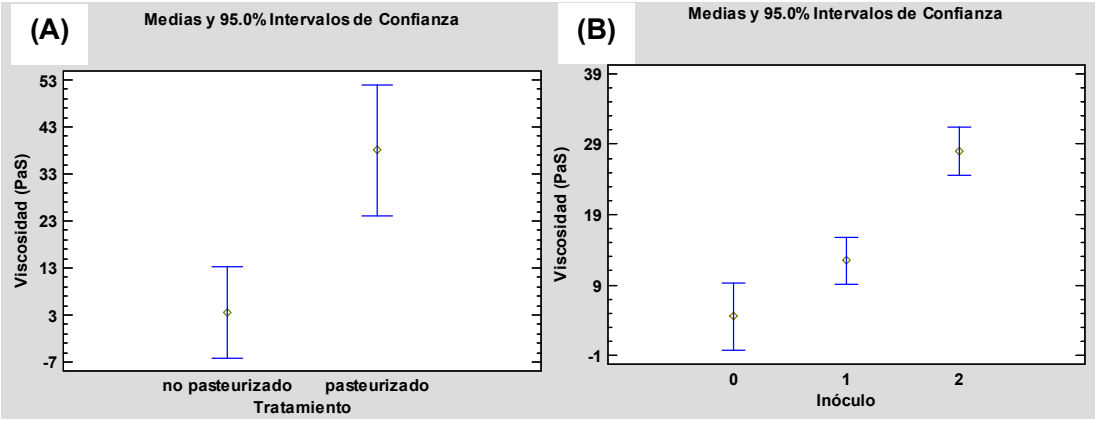


Figura 3. Gráfica de medias para viscosidad por tratamiento térmico (A) y por tipo de inóculo (B).

La evaluación por medio de FTIR, permitió identificar los principales grupos funcionales en las muestras analizadas (Figura 4).

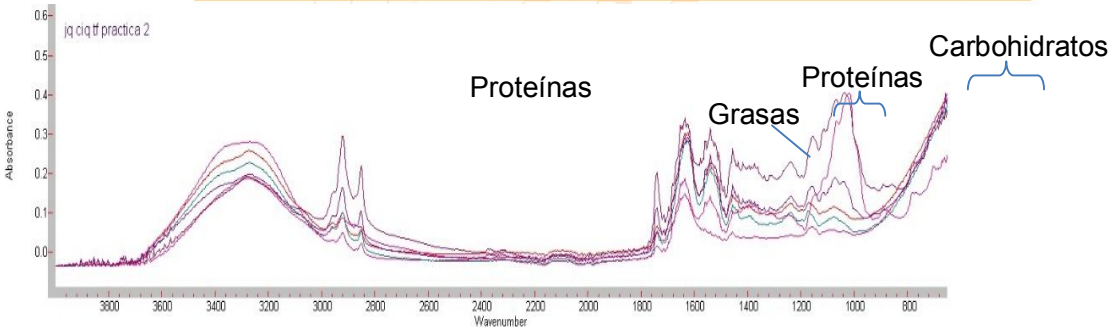


Figura 4. Espectros FTIR de las muestras estudiadas.

En la Figura 5, se pueden observar las diferencias del espectro generado por la leche pasteurizada, respecto a la leche sin pasteurizar, en donde los grupos funcionales están más expuestos en la leche pasteurizada, esto posiblemente por el efecto de la temperatura sobre la emulsión láctea.

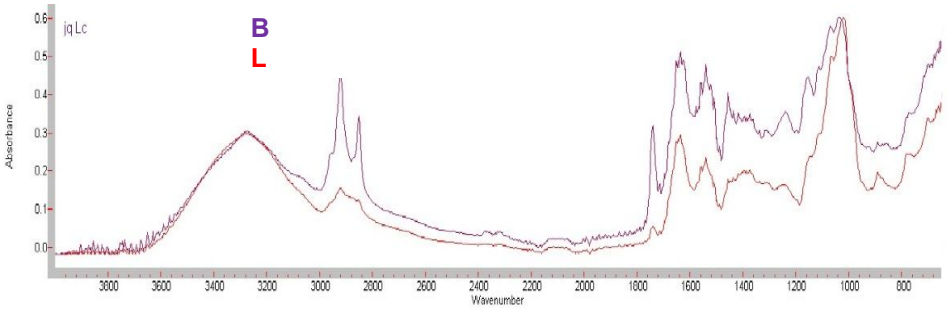


Figura 5. Espectros FTIR de las muestras de leche.

En la Figura 6, se pueden observar las diferencias de los espectros generados con la muestra de leche pasteurizada, en donde la señal de carbohidratos, practicamente desaparece en BI y en BIQ, mientras que la señal de proteínas en los 1600 nm^{-1} disminuye en la muestra elaborada con el inóculo 2.

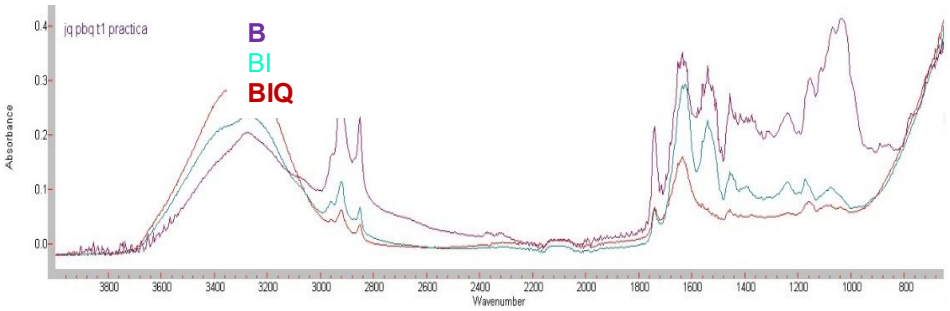


Figura 6. Espectros FTIR de las muestras de leche con tratamiento térmico

En la Figura 7, se observa que los grupos funcionales de proteínas y grasas hay una mayor absorbancia comparado con la señal de la leche, además se puede observar que entre los 1200 a 800 cm-1, la muestra de CI presenta una absorbancia mayor que la CIQ.

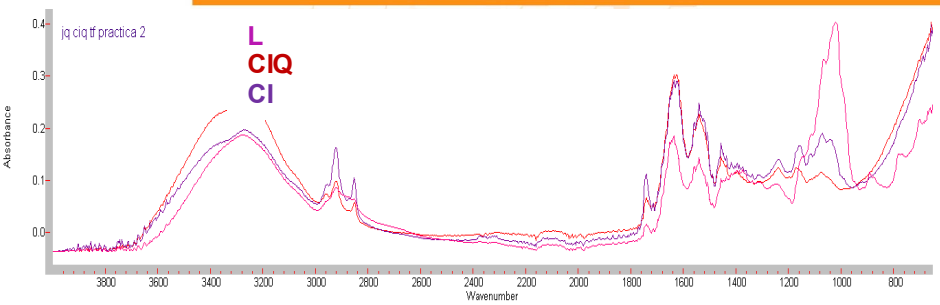


Figura 7. Espectros FTIR de las muestras de leche sin tratamiento térmico

Respecto a la composición microbiológica, la leche pasteurizada no presentó unidades formadoras de colonia (UFC) en los medios de CT, DP ni MRS, mientras que la leche no pasteurizada aporto microorganismos a los jocoques que se elaboraron con ella. Los microorganismos que presentaron mayor número de unidades formadoras de colonias fueron las bacterias ácido lácticas en todas las muestras de jocoques generadas (Tabla 2).

Tabla 2. UFC/ml de muestra

Muestra	Bacterias Ácido-Lácticas	Cuenta total	Hongos y Levaduras
L	7.50E+05	9.10E+05	6.00E+05
CI	3.25E+07	2.70E+07	3.06E+07
CIQ	4.00E+08	2.44E+07	1.68E+07
B	-	-	-
BI	1.13E+07	2.87E+07	2.10E+07
BIQ	1.68E+07	1.76E+07	2.40E+07
T	1.30E+09	1.24E+07	2.15E+07

CONCLUSIONES

Los tratamientos térmicos aplicados a la leche y el tipo de inóculo, dieron características particulares al jocoque obtenido, se encontró que parámetros como la acidez y pH presentaron diferencias significativas por tipo de inóculo, mientras que la viscosidad presentó diferencias significativas tanto para tipo de inóculo como para tratamiento térmico.

En este estudio se logró observar de forma general el efecto del tratamiento térmico y del tipo de inóculo, sin embargo, también puso de manifiesto que es importante profundizar en el tipo de inóculo y en la evolución de los parámetros durante el proceso de elaboración del jocoque.

REFERENCIAS

[1] Secretaría de agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. SAGARPA-SIAP, 2014. (2015, sep11). Disponible en http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/estadistica.aspx/.

[2] Z. Roughead *et al*., "Controlled Substitution of Soy Protein for Meat Protein: Effects on Calcium Retention, Bone, and Cardiovascular Health Indices in Postmenopausal Women," J. Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 90, pp.181–189, 2005.

[3] M.T. Liong and N.P. Shah, "Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains" J. Dairy Science, vol. 88, pp. 55-66, 2005.

[4] A. Tremblay and D.R. Joanisse, "Calcium intake, body composition and plasma lipid-lipoprotein concentrations in adults," J. of Dairy Technology, vol. 60, pp. 66-69, 2005.

[5] G. H. McIntosh, "Health aspects of dairy products. Colon cancer prevention," in Encyclopedia of Dairy Sciences, vol. III. H. Roginsky, J. Fuquay and P. Fox (Eds.). London, U.K. Academic, 2003, pp. 1301-1306.

[6] C. Pierart and J. Rozowsky, "Papel de la Nutrición en la Prevención del Cáncer Gastrointestinal," J. Chilena nutrición, vol. 33, pp 8-13, 2006.

[7] M. Thouvenot and J. Manríquez, "Diccionario náhuatl-español: basado en los diccionarios de Alonso de Molina con el náhuatl normalizado y el español modernizado," (2015, oct, 22). Disponible en: http://www.historicas.unam.mx/publicaciones/publicadigital/libros/diccionario/nahuatl.html/

[8] F. Cervantes-Escoto, "Los quesos mexicanos genuinos: patrimonio cultural que debe rescatarse," Estado de México, Mx. No. TX382. Q4, 2008.

[9] C. ALAIS, "Ciencia de la leche," in Continental (ed). Distrito federal, Mx. pp 400-405, 1988.

[10] P.F. Fox, *et Al*., "Dairy chemistry and biochemistry," 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-14892-2.

[11] R.S. KIRK, *et al*., "Composición y análisis de los alimentos," traduction of: Pearson's composition and analysis of food. 9 ed. 1991Continental (ed), Distrito federal, Mx, 1999.

[12] Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012 "Leche-Denominaciones, Especificaciones Fisicoquímicas, Información Comercial Y Métodos De Prueba" Prefacio. (2012, mar, 15)

[13] CODEX STAN 243-2003. Norma del Codex para leches fermentadas. 2010.

[14] T. Paseephol, *et al*., "Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition," J. Texture Studies, vol. 39. No.6, pp. 617-634, 2008.

[15] M. Nasanovsky, *et al*., "Lechería," Estados Unidos de América. Académico, pp 49-52, 2003.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE COMPLEJOS PROTEÍNA-POLISACÁRIDO.

Haro-González, J.N., y *Espinosa-Andrews, H.

Centro De Investigación y Asistencia En Tecnología y Diseño Del Estado De Jalisco A.C, Unidad de Tecnología Alimentaria, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México 45019.

*Autor para correspondencia: hespinosa@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
En este trabajo se estudiaron las propiedades reológicas de los complejos de gelatina con quitosano, pectina, goma arábiga Kordofán y goma arábiga Senegal, así como el efecto de la temperatura. Las propiedades reológicas se determinaron por un barrido de frecuencias. Los complejos presentaron un comportamiento elástico en ambas temperaturas. El módulo elástico presentó el siguiente orden a 4 °C, Gelatina-Pectina>Goma arábiga Senegal>Goma arábiga Kordofán>Quitosano; mientras que para 20 °C, el orden fue Gelatina-Quitosano>Pectina> Goma arábiga Senegal > Goma arábiga Kordofán. Los complejos estudiados mostraron una disminución en sus módulos a 20 °C respecto a los almacenados a 4 °C, los cuales presentaron un comportamiento de gel débil, exceptuando el complejo gelatina-Quitosano, el cual elevó su módulo elástico presentando un comportamiento de gel fuerte. Los complejos gelatina-Pectina y gelatina-Quitosano mantuvieron su estructura a bajas frecuencias. Estos comportamientos reológicos permitirán el uso de los complejos de gelatina en distintas aplicaciones como matrices texturizantes en la industria alimentaria.

Palabras clave: Coacervación compleja, complejos, gelatina, reología

INTRODUCCIÓN

Hoy en día los alimentos funcionales bajos en grasa o vegetarianos, buscan mantener la textura, con el propósito de controlar la percepción sensorial del alimento, una alternativa es el uso de complejos proteína-polisacárido, los cuales brindan estabilidad y propiedades viscoelásticas [1]–[3].

La gelatina es ampliamente utilizada en los productos alimenticios como postres, gomas de frutas, malvaviscos, pasteles, caramelos, yogurt, embutidos entre otros, debido a sus propiedades de texturizado, espesamiento, retención de agua, formación de espuma y adhesión/ cohesión [4]. La gelatina es una proteína derivada de la hidrólisis parcial del colágeno, cuya capacidad para formar geles térmicamente reversibles debajo de 35 °C, además es empleada para estabilizar alimentos [5]. La gelatina puede interactuar con polielectrolitos, como la pectina, xantanas, goma arábiga etc. Bajo condiciones específicas, la interacción entre proteínas y polisacáridos origina un fenómeno de agregación conocido como coacervación compleja, la cual consiste en la separación espontánea de los hidrocoloides resultado de las interacciones electroestáticas entre polielectrolitos opuestamente cargados. Estas interacciones están inducidas por estrés mecánico, temperatura o cambios de pH [5]–[7]. La formación de complejos es usada para brindar protección a componentes sensibles y mejorar propiedades fisicoquímicas, de textura y reológicas [7], [8].

Los barridos de frecuencias son pruebas oscilatorias realizadas a frecuencias variables, manteniendo constante la temperatura y la deformación. Estos barridos se utilizan para determinar la dependencia de la estructura al tiempo. a bajas frecuencias simulan un movimiento lento, mientras que a altas frecuencias es simulado un movimiento rápido [9]. El desarrollo de productos alimenticios requiere conocer y entender, ¿cómo los polímeros afectan las propiedades reológicas? y ¿cómo son percibidas sensorialmente? [10]. El objetivo de este trabajo fue comparar las propiedades reológicas de los complejos de gelatina con quitosano (Q), goma arábiga Kordofán(AK), goma arábiga Senegal(AS) y pectina(P); así como el efecto de la temperatura sobre las propiedades reológicas de los complejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La gelatina tipo B (de piel de bovino, Bloom de 225) y el quitosano se adquirieron de Sigma-Aldrich Inc (México), la pectina cítrica de alto metoxilo se adquirió de Cargill (México) y la goma arábiga Kordofán y la goma arábiga Senegal en lágrima se obtuvieron en Reasol (México).

Los complejos fueron formados de acuerdo con las metodologías propuestas por Prata y Grosso [8], Silva et al.[6] y Qv et al.[7]. Los sistemas se almacenaron por 48h a 4 °C y 20 °C. Pasado el tiempo, se evaluaron los módulos de almacenamiento y de pérdida (G' y G'') en un reómetro de estrés controlado AR 1000 (TA Instruments) con una geometría dentada (40 mm de diámetro y 1 mm de GAP). Se aplicó un barrido de frecuencia de 100 a 0.1 rad/s con 1% de deformación dentro de la RLVE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los complejos formados tuvieron un comportamiento elástico en el rango de frecuencia analizado, debido a que el módulo elástico (G') fue superior al módulo viscoso (G") en ambas temperaturas de almacenamiento (Figs. 1 y 2). Del mismo modo ningún complejo presentó un cruce en sus módulos.

A bajas frecuencia, los complejos almacenados a 4 °C presentaron el siguiente orden gelatina-P>AS>AK>Q. El sistema gelatina-P fue 10 veces más fuerte que el complejo gelatina-Q y 2 veces más que los complejos gelatina-goma (AS y AK). Por otro lado, a altas frecuencias, el sistema gelatina-P fue 14 veces más fuerte, sin embargo para AS y AK la relación no cambió (Fig. 1).

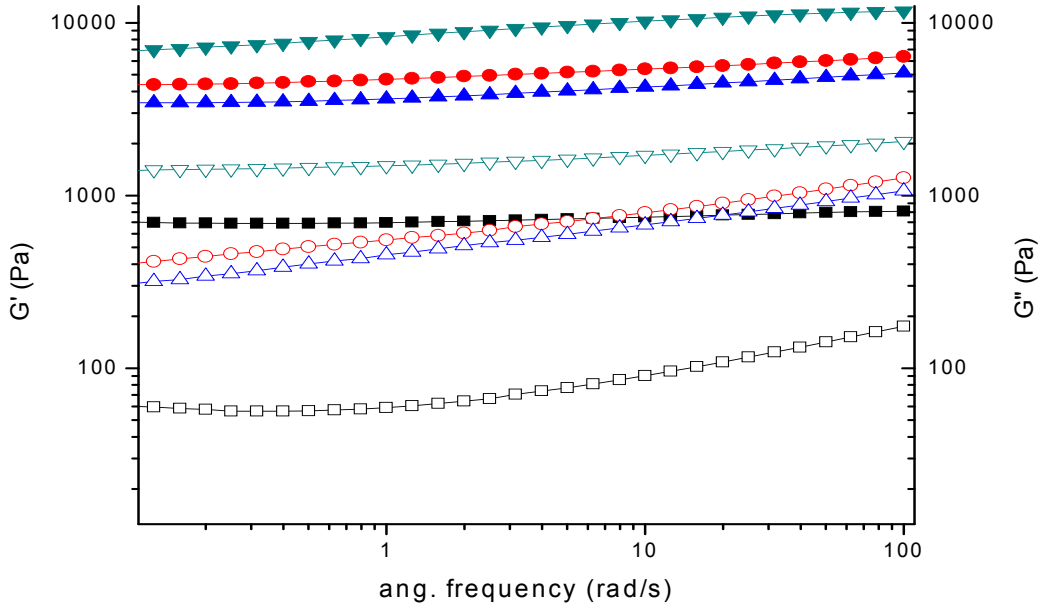


Fig. 1. Perfil reológico de complejos de gelatina. Los símbolos sólidos representa el módulo elástico, los símbolos abiertos representa el módulo viscoso a la temperatura de 4 °C. ■ Gelatina-Q, ● Gelatina-AS, ▲ Gelatina-AK y ▼ Gelatina-P.

Mientras que durante el almacenamiento a 20 °C, a bajas frecuencias el complejo gelatina-Q fue más fuerte que los otros sistemas, es decir, 7 veces más que el gelatina-P, 12 veces más que el gelatina-AS y por último 15 veces más que el gelatina-AK. A altas frecuencias, la proporción de estructura fue de 3 veces más que gelatina-P, 14 veces más que gelatina-AS y 18 veces más que gelatina-AK (Fig. 2).

En general, los complejos almacenados a 20 °C mostraron una disminución mayor de los módulos reológicos respecto a los almacenados a 4 °C. Presentando geles con una estructura débil; debido a que la deformación presenta dependencia del tiempo, a excepción del complejo gelatina-Q, el cual muestra una linealidad en el módulo G', además de que aumentó el grado de estructuración a 20 °C.

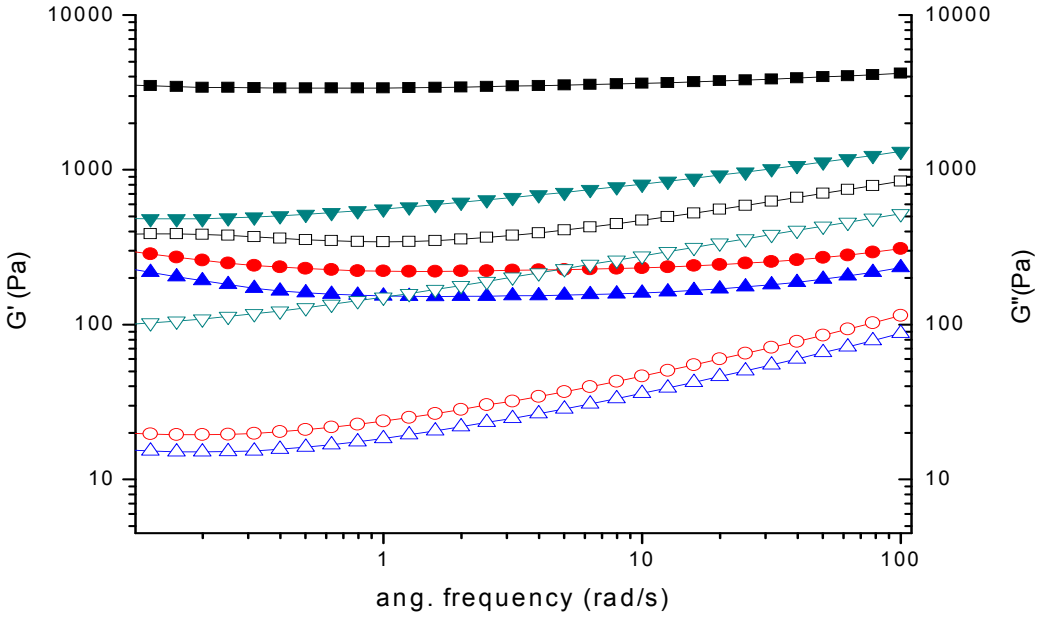


Fig. 2. Perfil reológico de complejos de gelatina. Los símbolos sólidos representa el módulo elástico, los símbolos abiertos representa el módulo viscoso a la temperatura de 20 °C. ■ Gelatina-Q, ● Gelatina-AS, ▲ Gelatina-AK y ▼ Gelatina-P.

En la Fig. 3 se puede observar el factor de pérdida o tanδ, el cual muestra la relación entre la fracción elástica y la viscosa. Todos los complejos tuvieron un aumento en la fracción viscosa, reduciendo la sinéresis de los geles, excepto el complejo gelatina-P a 4 °C, el cual aumentó la fracción elástica a altas frecuencias y por consecuencia muestra una estructura más rígida.

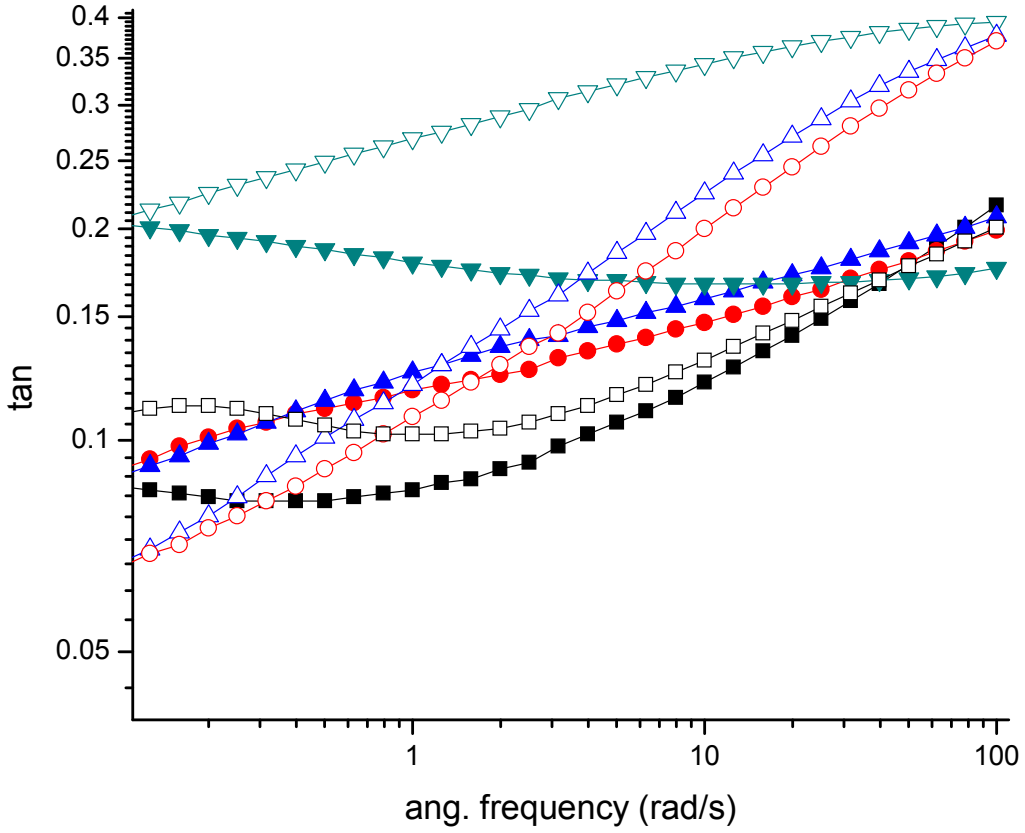


Fig. 3. Tanδ de los de complejos de gelatina-polisacáridos. Los símbolos sólidos representan la temperatura de 4 °C, los símbolos abiertos representan la temperatura de 20 °C. ■ Gelatina-Q, ● Gelatina-AS, ▲ Gelatina-AK y ▼ Gelatina-P

A bajas frecuencias los complejos gelatina-Q y gelatina-P almacenados a 4 °C y el complejo gelatina-Q mantienen los valores de tanδ, lo que significan su estabilidad en largos periodos de reposo, y por lo tanto, su estructura. Mientras que a altas frecuencias, los complejos gelatina-goma (AS y AK) y gelatina-P almacenados a 20 °C, presentaron un aumento en su valor de 6 y 2 veces, respectivamente.
El comportamiento del complejo gelatina-Q es probable que se deba a la lenta ionización del quitosano, formando partículas que no permitan la exposición de los sitios cargados del quitosano para acomplejarse con la gelatina. A pesar de que al pH de formación de los complejos, los polímeros tienen carga opuesta, no es lo suficientemente alta para presentar geles fuertes [8]. Mientras que el sistema gelatina-P, forma el coacervado por la reacción entre los grupos de la gelatina y la pectina, los cuales bajo condiciones ácidas sus cargas son opuestas, favoreciendo las interacciones y la formación de complejos [11]. La formación de los coacervados de gelatina con goma es promovida por las interacciones electrostáticas en lugar de reacciones químicas [7].

CONCLUSIONES

Las propiedades reológicas de los complejos electroestáticos son afectadas en función de las interacciones electrostáticas entre la gelatina y los distintos polielectrolitos. La temperatura debilita la estructura de los complejos, a excepción del complejo gelatina-quitosano. Estas propiedades permitirán el uso de los complejos distintas aplicaciones como matrices texturizantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores extienden su agradecimiento al "Fondo de Investigación Básica SEP-CONACYT" CB-2015-01-258118 por el financiamiento de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

[1] L. Wang, Y. Cao, K. Zhang, Y. Fang, K. Nishinari, y G. O. Phillips, "Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between κ-carrageenan and gelatin", *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2015.

[2] S. L. Turgeon y S. I. Laneuville, "Protein + Polysaccharide Coacervates and Complexes. From Scientific Background to their Application as Functional Ingredients in Food Products", en *Modern Biopolymer Science*, 2009.

[3] E. Çakir y E. A. Foegeding, "Combining protein micro-phase separation and protein-polysaccharide segregative phase separation to produce gel structures", *Food Hydrocoll.*, 2011.

[4] I. J. Haug y K. I. Draget, "6 - Gelatin BT - Handbook of Hydrocolloids (Second edition)", en *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 2009.

[5] M. T. Nickerson, A. T. Paulson, E. Wagar, R. Farnworth, S. M. Hodge, y D. Rousseau, "Some physical properties of crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels", *Food Hydrocoll.*, vol. 20, núm. 7, pp. 1072–1079, 2006.

[6] D. F. Silva, C. S. Favaro-Trindade, G. A. Rocha, y M. Thomazini, "Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation", *J. Food Process. Preserv.*, 2012.

[7] X. Y. Qv, Z. P. Zeng, y J. G. Jiang, "Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability", *Food Hydrocoll.*, 2011.

[8] A. S. Prata y C. R. F. Grosso, "Production of microparticles with gelatin and chitosan", *Carbohydr. Polym.*, 2015.

[9] T. G. Mezger, "The Rheology Handbook", *Hann. Curt R Vincentz Verlag*, 2006.

[10] D. Renard, F. Van De Velde, y R. W. Visschers, "The gap between food gel structure, texture and perception", en *Food Hydrocolloids*, 2006.

[11] M. Saravanan y K. P. Rao, "Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules", *Carbohydr. Polym.*, 2010.

COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA EXTRACCIÓN DE ACEITE DEL SALVADO DE ARROZ.

[1]Villanueva-Sánchez, J., [1]Bravo-Rivera, G., [1]González-Rosendo, G., [1]Puga-Díaz, R., [1]Pérez-Alarcón, A.I., [2]Saldo-Periago, J. y [1]Quintero-Gutiérrez, A.G.

1. Departamento de Nutrición y Alimentos Funcionales-CeProBi. Instituto Politécnico Nacional. Calle CEPROBI No 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731. Teléfono +52 7353942020.
2. Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona Facultat de Veterinària 08193 Bellaterra (Barcelona), teléfono +34 93 581 29 14.

*Autor para correspondencia: jvillanuevas@ipn.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El salvado de arroz (SA) es una excelente fuente de fibra, minerales, proteínas y aceite comestible de alto valor funcional. Contiene una considerable cantidad de ácidos grasos insaturados como: linolénico, linoléico y oleico. Además, es rico en compuestos antioxidantes como tocoferoles, tocotrienoles y gamma-orizanol; sobre los que hay evidencia científica de sus efectos benéficos para la salud. Algunas técnicas para extraer el aceite del salvado de arroz son: prensado, destilación por arrastre de vapor, extracción química por soxhlet y CO2 supercrítico. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y comparar el aceite de salvado de arroz extraído por tres técnicas (prensado, soxhlet y CO2 súpercrítico). El salvado de arroz fue obtenido de un molino de la región oriente de Morelos, se estabilizó previamente con un tratamiento de calor húmedo. Se realizaron extracciones de aceite por prensado en frío, soxhlet (etanol) y CO2 súpercrítico. Se evaluaron parámetros de calidad de los diferentes extractos como: Índice de yodo, Índice de peróxidos y la concentración de gamma-Orizanol. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y pruebas post-hoc a un nivel de significancia de 0.05. El rendimiento de aceite por la técnica de prensado fue de 5%, con soxhlet de 23% y de 3.5% con CO2 supercrítico. Se observó un índice de yodo de 95.59 para prensado, 92.35 a través de soxhlet y 92.08 para CO2 súpercrítico. El índice de peróxidos fue de 24.73 para prensado, 18.44 para soxhlet y 5.57 CO2 súpercrítico. Los aceites mostraron un contenido de gamma-Orizanol de 70.7 mg/100g con el prensado, de 76.4 mg/100g para soxhlet y de 10.8 mg/100g para CO2 supercrítico. El aceite de salvado de arroz presenta características que varían dependiendo de la técnica de extracción utilizada. Aunque los extractos presentan un mismo grado de instauración, la extracción por soxhlet con etanol como disolvente, obtuvo mayor rendimiento comparado con las otras dos técnicas; así como un mayor contenido de gamma-orizanol. El aceite extraído por prensado presenta también un mayor grado de susceptibilidad a la oxidación. Se recomienda profundizar en la investigación de dichas técnicas para hacer posible el uso del aceite de SA como ingrediente y alimento funcional.

Palabras clave: Salvado de arroz; Soxhlet; Extracción de aceite; Prensado; Co2 Supercrítico.

REFERENCIAS

[1] Del Valle J. y Aguilera J. 1999. Review; high pressure CO2 extraction. Fundamentals and applications in the food industry. Food Science and Technology. 5:1-24.

[2] Goufo P. y Trindade H. 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, -oryzanol, and phytic acid. Food Science & Nutrition. 2(2): 75-104.

[3] Kim S, Chung H y Lim S. 2014. Effect of various heat treatments on rancidity and some bioactive compounds of rice bran. Journal of Cereal Science 60: 243-248.

NON-THERMAL ALTERNATIVE APPLIED TO PUMPKIN SEED MILK FUNCTIONAL BEVERAGE.

*Suárez-Jacobo, A., Leal-Huerta, R.Y., Ponce-Hernández, J.S. y Garcia-Fajardo, J.A.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. –Unidad Noreste Vía de innovación 404, PIIT, Autopista Monterrey-Aeropuerto Km.10 Apodaca, Nuevo León, 66629, México.

*Autor para correspondencia: asuarez@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

Non-thermal preservation methods are gain interest for food scientists, industry and consumers because they offer a minimal impact on the quality, nutritional and sensory properties of foods, at the same time to provide an extended shef-life. For example, high pressure homogenization (HPH) treatment has emerged as a novel additive-free food preservation technology. Heat treatments have been the commonly used preservation method in beverages however it can negatively affect the nutritional and sensorial qualities of the product. Frequently, pumpkin seeds (Cucurbita argyrosperma), a rich source of bioactive compounds have been used as functional foods or alternative medicine in some countries. On the other hand, vegetable milks are an alternative to all the people who can not drink dairy milk for multiple reasons (medical or ethical); also the consumption of functional beverage around the world have experimented a noticeable increase in the last decade due to a positive impact in the human health. In the present research work, the effect of high pressure homogenization (HPH) at 100MPa,200MPa, 200 at 5 passes combined with 60° of inlet temperature in pumpkin seeds milk were processed and samples were stored at 4°C. Microbial analysis (total mesophilic aerobic bacteria, lactic acid bacteria and enterobacterial counts) were performd immediately after treatments. HPH-treated functional beverage at 200MPa (5 passes) present a similar microbial reduction in comparison to pasteurized one. The present research work can offer a value added of pumpkin seed and impulse ther consumption asan alternative vegetable milk to people who present lactose intolerance or vegan consumers. Non-thermal processes, such HPH, also meet industry needs by offering value-added products, new market opportunities and added safety margins.

Palabras clave: Pumpkin seed milk; high pressure homogenization.

REFERENCIAS

[1] Donsí, F., Annunziata, M. y Ferrari, G., 2013. Microbial inactivation by high pressure homogenization: Effect of the disruption valve geometry. Journal of Food Engineering. 115: 362–370.

[2] Poliseli, S. F. H., Hernandez, H. M., Guamis, B. y Ferragut, V., 2014. Sterilization and aseptic packaging of soymilk treated by ultra high pressure homogenization. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 22:81–88.

CULTIVO DEL "HONGO BLANCO PATÓN" (*Pleurotus albidus* [BERK.] PEGLER, 1983) RECURSO FÚNGICO ALIMENTICIO QUE CRECE Y SE CONSUME EN EL NORTE DE HIDALGO, MÉXICO.

[1*]Camacho-Quiroz, M., [2]Moreno-Fuentes, Á., [3]Garín-Aguilar, M.E., [1]Cruz-Solorio, A., y [1]Valencia-del-Toro, G.

1. Laboratorio de Cultivos Celulares de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. UPIBI, Instituto Politécnico Nacional. Barrio la Laguna s/n Ticomán. Ciudad de México C.P. 07340, México.
2. Laboratorio de Etnobiología, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Apartado Postal 1-69, Plaza Juárez, Pachuca, Hidalgo, C.P. 42001, México.
3. Laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. de los Barrios No.1. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, C.P. 54090. México.

*Autor para correspondencia: camacho.monica@ciencias.unam.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
La recolección, caracterización y conservación de los recursos genéticos fúngicos son temas de gran importancia científica, biológica e industrial y constituyen estrategias fundamentales para el desarrollo de nuevas generaciones de cepas comerciales [1]. En el presente trabajo se realizó la colecta de una cepa silvestre (*Pleurotus albidus)* y posteriormente, ésta y una cepa de colección (*Pleurotus djamor*) se cultivaron con la finalidad de comparar sus velocidades de crecimiento micelial en medios de cultivo sólido y semillas de trigo. Al momento de la fructificación de estas cepas se determinaron los parámetros de productividad. Los resultados indican que la velocidad de crecimiento micelial en medio sólido fue similar en ambas cepas (8.39 mm/día y 8.29 mm/día para *P. albidus* y *P. djamor*, respectivamente); mientras que en la semilla de trigo, la velocidad de crecimiento fue mayor para *P. djamor* con 1013.52 mm^3/día y para *P. albidus* 738.82 mm^3/día. Con respecto a los parámetros de productividad la EB para *P. albidus* fue de 39.49%, TP fue de 1.23% y R de 8.80%, mientras que en *P. djamor* la EB fue de 40.22%, TP de 1.08% y R de 8.96%. El aislamiento de ésta cepa silvestre, permitirá proponer el desarrollo del cultivo a otro nivel, aprovechando su potencial para optimizar la producción comercial y el mejoramiento genético de cepas de *Pleurotus*.

Palabras clave: *Pleurotus albidus; Pleurotus djamor;* crecimiento micelial; productividad.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de hongos alimenticios constituye un sistema de producción-consumo que ha adquirido en el mundo gran relevancia social, económica y ecológica. Se trata de procesos biotecnológicos aplicados que pueden desarrollarse a pequeña y gran escala [2] para producir y aprovechar un recurso natural. Éste proceso biotecnológico ha tomado un real interés y a nivel internacional, es una actividad rentable, bastante dinámica y competitiva [3].

En el mundo se han estudiado para fines de cultivo, alrededor de 200 especies de hongos comestibles, de las cuales aproximadamente 60 se cultivan comercialmente y cerca de 10 se cultivan a escala industrial [4].

Todas las especies de *Pleurotus* son lignícolas saprófitas o parásitas, pertenecen al grupo de los hongos de la pudrición blanca y se han catalogado como descomponedores de maderas duras y blandas [1]. Sin embargo, los hongos saprófitos que se han logrado aislar presentan complicaciones técnicas como la preparación de sustratos adecuados, el control de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, aireación, etc.), los cuales son

factores necesarios para el desarrollo y crecimiento de los hongos macromicetos. De no tener cuando menos los conocimientos básicos sobre la biología de los hongos los ensayos de cultivo pueden fracasar [5].

Diversos grupos de trabajo encaminan sus esfuerzos en el manejo y conservación del germoplasma de cepas de hongos silvestres locales, las cuales constituyen un valioso recurso para optimizar la producción comercial y el mejoramiento genético. Tal es el caso de los investigadores Moreno-Fuentes y Bautista-Nava, quienes en 2005 [6] identificaron uno de los hongos blancos del estado de Hidalgo, *P. albidus* el cual es conocido como "hongo blanco patón", "hongo blanco de chaca" u "hongo de jonote". Cuya morfología consta de basidiomas onfalinoides, clitocibioides o pleurotoides, estipitados. Píleo de 20 a 60 mm de diámetro, infundibuliforme, circular o semicircular, muy higrófano, superficie húmeda, blanca, blanquecina de color crema o blanco-grisácea, margen entero a laciniado. Láminas decurrentes, blancas a blanquecinas. Estípite 20-40 (-75) x 4-8 mm, central o más común excéntrico, cilíndrico, superficie húmeda, ligeramente fibriloso hacia la base, concoloro con el píleo. Contexto carnoso-fibroso, de 4-8 mm de espesor en el píleo, blanquecino, con olor y sabor agradables. Esporada blanca. [6] Dado que este hongo silvestre resultó ser un nuevo registro taxonómico y etnomicológico para México, en estos momentos resulta necesario asegurar su cultivo y producción.

Por lo anterior, en el presente trabajo se colectó y aisló una cepa silvestre (*P. albidus)* también conocida por la comunidad en donde lo consumen como "hongo blanco" patón. Con el fin de comparar los parámetros de crecimiento y vigor micelial de la cepa silvestre con respecto a los de la cepa de colección *P. djamor*. A través de técnicas micológicas de laboratorio, se caracterizó el crecimiento del micelio de ambas cepas en medios de cultivo sólido y semilla de trigo previamente hidratada y pasteurizada. Asimismo, se indujo la fructificación de esporomas, a través del control de temperatura y concentración de oxígeno, en sustrato de paja de cebada también previamente hidratada y pasteurizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Recolecta y obtención de cepas

Se utilizaron dos cepas del género *Pleurotus,* una silvestre de *P. albidus* y un control de *P. djamor*. Se recolectaron esporomas de *P. albidus* en el Norte del Estado de Hidalgo y fueron transportados al laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), del Instituto Politécnico Nacional (IPN). La cepa control IE201 *(P. djamor),* es de colección y se encuentra depositada en el mismo laboratorio.

Aislamiento

El cultivo axénico de *P. albidus*, se obtuvo bajo condiciones de asepsia partiendo un esporoma por la mitad y tomando una pequeña fracción del contexto del cuerpo fructífero con pinzas esterilizadas evitando el contacto con la parte exterior del mismo para no arrastrar factores contaminantes (Fig. 1). Utilizando un asa micológica se tomaron fracciones de dicho contexto y se inocularon cajas Petri con medios de cultivo conteniendo extracto de malta agar (EMA), papa dextrosa agar (PDA) y antibiótico de tipo penicilina y cloranfenicol en diferentes concentraciones. Posteriormente, para verificar el crecimiento de micelio dicariótico, se realizó la búsqueda de fíbulas observando el micelio al microscopio óptico con objetivo 40x. Por otro lado, la cepa testigo se resembró en cajas con medios de EMA-PDA y ambas cepas se incubaron a 28 °C.

Fig. 1 Obtención de una fracción del contexto del hongo con pinzas previamente esterilizadas.



Estudio biológico
Velocidad de crecimiento en medio sólido
Una vez que se observó crecimiento en ambas cepas, se tomó una fracción de micelio de 0.5 cm de diámetro y se inoculó en el centro de cajas Petri de 80 mm de diámetro con medio de cultivo sólido EMA-PDA con un volumen de 15 mL por caja, se incubaron a 28 °C, se realizaron mediciones cada 24 horas de ambas cepas, comenzando por el día 0 (inoculación) hasta la colonización total de las cajas y se comparó la velocidad de crecimiento en ambas cepas.

Velocidad de crecimiento en semilla de trigo
Con las cajas Petri invadidas por el micelio de ambas cepas, se produjo inóculo de semilla de trigo previamente hidratado y pasteurizado en bolsas de polipapel. Se midió el crecimiento del micelio cada 24 horas, comenzando por el día en que el crecimiento se encontró homogéneo en todas las bolsas hasta la colonización de la semilla y se comparó la velocidad de crecimiento en ambas cepas.

Obtención de cuerpos fructíferos
Para la obtención de esporomas o cuerpos fructíferos de cada cepa, el sustrato de paja de cebada previamente hidratada y pasteurizada, se inoculó con la semilla de trigo colonizada por el micelio y durante la fructificación, se controlaron las condiciones de temperatura y la luz. Se calcularon los parámetros de productividad de eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y rendimiento (R).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Material Biológico
Aislamiento

Aproximadamente, a los 10 días de realizado el cultivo axénico de *P. albidus*, se encontró crecimiento de micelio en tres cajas con medio sólido EMA-Agar con 1 mL de penicilina (Fig. 2), y se verificó la presencia de fíbulas en esta cepa (Fig. 3)



Fig. 2 Caja con crecimiento de micelio.

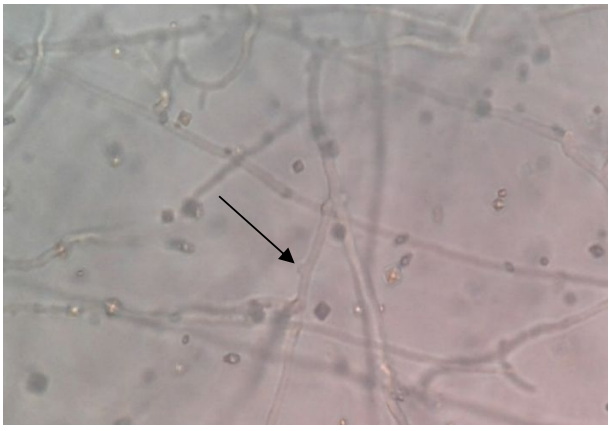


Fig.3 Presencia de fíbula que comprueba el crecimiento de micelio dicariótico de *P. albidus*. Microscopio óptico, objetivo 40x.

Estudio biológico

Velocidad de crecimiento en medio sólido

En la Fig. 4 se muestra la velocidad de crecimiento de las cepas cultivadas a 28°C. Se observó que la velocidad de invasión del medio EMA fue similar entre las cepas, *P. albidus* alcanzó la colonización completa de la caja a los 10 días con velocidad de 8.39 mm/día, mientras que *P. djamor* colonizó la caja a los 9 días y velocidad de 8.29 mm/día. En 2013 Carreño *et al.* [1] compararon la velocidad de crecimiento micelial en medio sólido (EMA y PDA) de 2 cepas nativas de Tabasco *P. albidus y P. djamor* los autores observaron que durante el periodo de incubación hubo diferencias en la velocidad de crecimiento micelial. *P. albidus* colonizó el diámetro de la caja de Petri (84 mm de diámetro) en un periodo de 7 a 9 días a 26 °C y 30 °C y en el caso de *P. djamor,* los periodos mínimos de incubación se registraron en PDA a los 10 días y los máximos en EMA a 30 °C, con 13 a 15 días. Es evidente que los datos de velocidad de crecimiento en medio EMA de la cepa silvestre *P. albidus* colectada en Hidalgo son consistentes con los reportados por estos autores con la cepa silvestre de Tabasco. También se ha señalado que cepas de la misma especie (*P. dejamor*) en zonas templadas registran periodos de incubación que varía de 9, 19, 20 y hasta 25 días en una temperatura de 25 °C [8].

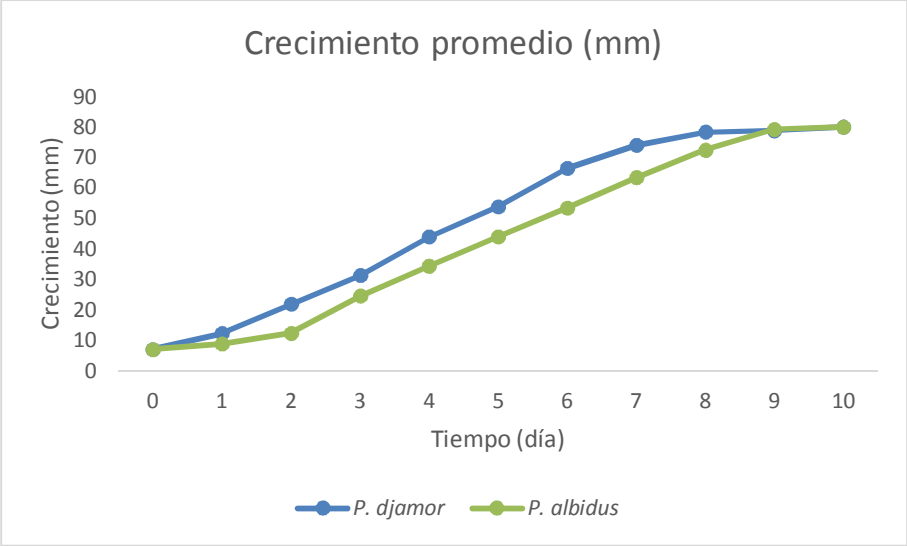


Fig. 4 Crecimiento micelial de ambas cepas en medio de cultivo sólido (EMA).

Velocidad de crecimiento en semilla de trigo

En la **Fig. 5** se muestra el volumen de invasión del inóculo de ambas cepas en la semilla de trigo en función del tiempo. Se observa que el volumen de invasión micelial en *P. djamor* fue mayor con 1013.52 mm^3/día, invadiendo la semilla de trigo en 10 días, a diferencia de *P. albidus* con 738.82 mm^3/día, invadiendo la semilla en 14 días. Esta diferencia puede explicarse a la posible adaptación que ya ha tenido la cepa comercial de *P. djamor.*

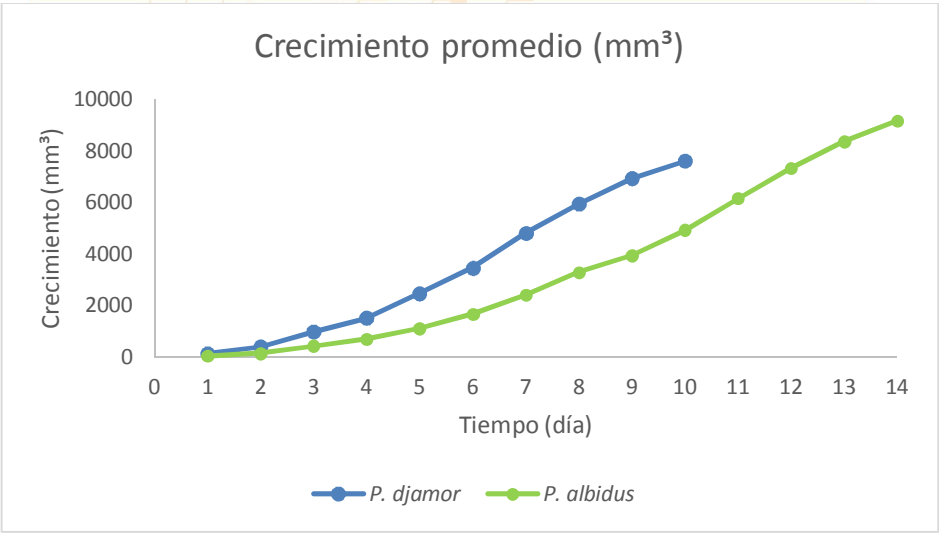


Fig. 5 Crecimiento micelial de ambas cepas en semillas de trigo

Obtención de cuerpos fructíferos

Con respecto a los parámetros de productividad obtenidos en este estudio, estos fueron similares entre las cepas silvestre y comercial. Para dos cosechas en ambas cepas, la EB para *P. albidus* fue de 39.49 %, la TP fue de 1.23 % y el R de 8.80 % y en *P. djamor* la EB fue de 40.22 %, la TP de 1.08 y el R de 8.96 % (Cuadro 1).

Cuadro 1. Parámeros de productividad (%)

Cepa	EB	TP	R
P. albidus	39.48	1.23	8.80
P. djamor	40.22	1.08	8.96

EB: Eficiencia biológica, TP: tasa de producción, R: rendimiento

En 2011 Lechner *et al.* [7] calcularon parámetros de productividad para las cepas Argentinas de la misma especie, obteniendo para *P. albidus* una EB en paja de trigo de 171.3 % para tres cosechas. Sin embargo, es importante señalar que estos autores añadieron suplementos al sustrato (paja de trigo), los cuales fueron harina de trigo, harina de avena y $CaCO_3$; asimismo, obtuvieron una EB de 112. 3 % para *P. djamor* cultivado en paja de trigo suplementada con $CaCO_3$. Es probable que la presencia de estos suplementos favoreciera que estos parámetros de productividad fueran mayores. Si bien la productividad depende de la cepa utilizada, la formulación del sustrato juega un papel importante. Stamets [9] reportó que las cepas de *P. cystidiosus* de Tailandia y Taiwán produjeron cosechas altas en paja de arroz y bajos rendimientos en paja de trigo; esto indica que puede haber cepas más estrictas en sus requerimientos para fructificar. Sin embargo, la EB alcanzada en este estudio con la cepa silvestre *P. albidus* se encuentra entre los valores de EB de otras cepas de *Pleurotus*.

Los hallazgos de este trabajo con el cultivo y determinación de los parámetros de productividad del hongo silvestre *P. albidus* se suman a los que destacan la importancia de enriquecer los bancos de germoplasma, así como promover el consumo de las especies fúngicas encontradas en las comunidades autóctonas del país y preservar las especies con importancia cultural. Es conveniente complementar este estudio con otros que evalúen las características morfológicas de los cuerpos fructíferos de *P. albidus*.

CONCLUSIÓN

Los parámetros de crecimiento y vigor micelial de la cepa silvestre *P. albidus* con respecto a los de la cepa de colección *P. djamor* hacen evidente su potencial para el cultivo industrial y el mejoramiento genético de cepas de *Pleurotus*.

REFERENCIAS

[1] S. D. Carreño, S. Capello, R. Gaitán, J. Cifuentes y J. E. Rosique "Caracterización del crecimiento micelial *in vitro* de *Pleurotus albidus* Pegler 1983 y *Pleurotus djamor* Boedijn 1959" *Revista de Divulgación Kuxulkab',* vol. XIX, no. 37, p. 37, julio - diciembre 2013.

[2] V. Mora y D. Martínez. "Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México." En *El Cultivo de setas Pleurotus* ssp. *en México,* editores: J. Sánchez, D. Martínez, G. Mata y H. Leal. Primera edición, El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas. 2007, pp. 7 – 8.

[3] D. Martínez, A. Larqué, M. Aliphat, A. Aguilar, M. Bonilla y W. Martínez, "La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México," en *II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT*, México, D. F., 2000, pp. 193-207.

[4] I. Morales y R. Flores. "Caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de *Neolentinus ponderosus* y *N. lepideus*." Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Pp. 1 – 50, 2007.

[5] A. Palacios, "Aportaciones para conformar taller de cultivo de hongos comestibles en internado de niños indígenas de Oaxaca," tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México, DF. 2010, pp. 14.

[6] Á. Moreno, y E. Bautista, "El "hongo blanco patón", *Pleurotus albidus*, en Hidalgo. Su primer registro en México." *Revista Mexicana de Micología*, vol. 22. pp. 43-47 mayo 2006.

[7] B. E. Lechner, y E. Albertó, "Search for new naturally occurring strains of Pleurotus to improve yields. Pleurotus albidus as a novel proposed species for mushroom production." Revista Iberoamericana de Micología, vol. 28 No. 04. pp 150 – 153, enero 2011.

[8] M. Sobal, D. Martínez-Carrera, P. Morales y S. Russos, "Classical characterization of mushroom genetic resourses from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional*, 19(01): 15-23.

[9] P. S. Stamets, "Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms". Berkeley: Ten Speed Press; 1993.

PRINCIPALES BACTERIAS PRESENTES EN LA TUBA GUERRERENSE Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

[1]Astudillo-Melgar, F., [2]Utrilla-Carreri, J., [3]Ochoa-Leyva, A., y [1]*Huerta-Beristaín, G.

1. Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria Sur. Chilpancingo, Guerrero.
2. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Genómicas, Av. Universidad s/n Col. Chamilpa 62210, Cuernavaca, Morelos.
3. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa 62210, Cuernavaca, Morelos.

*Autor para correspondencia: hbgerardo@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La Tuba es una bebida elaborada en el Estado de Guerrero a partir de la fermentación de la savia colectada de las inflorescencias de las palmeras (*Coccus nucifera* L.); es un producto no industrializado, del cual se tiene poca información científica sobre su composición química, beneficios a la salud y otras aplicaciones biotecnológicas, sin embargo de manera empírica se consume como auxiliar en enfermedades estomacales. El propósito del presente trabajo fue identificar las principales especies bacterianas de la tuba usando tecnologías de secuenciación de siguiente generación mediante la elaboración de librerías del gen 16S rRNA obtenidas de muestras de tuba fermentada en condiciones de temperatura controlada en diferentes tiempos de fermentación. Como resultados se obtuvieron 123 unidades taxónomicas operacionales (OTUs), cuyas especies más representativas se englobaron en 3 grupos: bacterias ácido lácticas pertenecientes a las familias de Leuconostocaceae y Streptococcaceae. Bacterias ácido acéticas principalmente de la familia Acetobacteraceae y algunas Proteobaterias.

Existen reportes en donde bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de producir metabolitos con actividad contra patógenos. Por lo anterior se infiere que la tuba guerrerense puede tener un efecto benéfico a la salud promovido por las especies bacterianas presentes durante el proceso de fermentación.

Palabras clave: Tuba; OTU; diversidad bacteriana.

INTRODUCCIÓN

La fermentación es un proceso en cual involucra la acción de microorganismos que se encargan de procesar y preservar diferentes alimentos y bebidas mediante la transformación de sustratos a diversos metabolitos [1]. Dentro de los principales compuestos generados en este proceso encontramos acetato, lactato, etanol, compuestos aromáticos, etc. [2]. Estudios sobre diversidad bacteriana en productos fermentados han reportado 2 grandes grupos de bacterias que predominan; las ácido lácticas y las ácido acéticas, sin embargo, también han reportado algunas Proteobacterias como *Zymomonas* que está estrechamente relacionada con la producción de etanol durante la fermentación [3].

Existen diferentes técnicas para determinar la diversidad bacteriana y se dividen en dos grandes grupos; aquellas que incluyen a los microrganismos cultivados (cultivables) y aquellos microorganismos que no dependen de cultivos (no cultivables). La gran desventaja que poseen los primeros es que la diversidad relativa es muy baja ya que más del 90% de las bacterias son no cultivables [4]. Las nuevas tecnologías de secuenciación han permitido estimar con mayor precisión la diversidad bacteriana presente en una muestra específica, basadas en la secuenciación de *Illumina* y la generación de librerías genómicas del gen 16S rRNA. Esta técnica ha disminuido el error de estimación de la diversidad que se obtienen con análisis convencionales como el DGGE y la secuenciación de Sanger [5].

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y fermentación de la tuba

Se tomó una alícuota de 500 mL de savia de la tercera espata de forma descendiente de una palmera visiblemente sana y se pusieron 100 mL en 4 matraces cada uno correspondió a los tiempos 0, 12, 24 y 35 horas de fermentación a 30°C con agitación de 110 rpm. Como control se adquirió una muestra de tuba de un local. Todas las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos para la obtención del *pellet* celular.

Extracción de ADN y generación de librerías

La extracción de ADN metagenómico se llevó a cabo con el kit ZR *Soil Microbe DNA MiniPrep™*. La generación de librerías se realizó según el protocolo de Illumina support.ilumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.ilmn

Análisis de resultados

Las secuencias se analizaron a través del programa QIIME versión -1.9.1-amd64.vdi, el cual permitió la identificación taxonómica y tablas de OTUs (unidades taxonómicas operacionales).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colecta de muestras

La colecta se llevó a cabo en la zona diamante de Acapulco Guerrero, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Datos de las colectas de tuba.

Muestra	Fecha de colecta	Lugar de colecta	Cantidad	Imagen
Palmera	14/07/2016	Comunidad Poza-Zanja	500-600 mL	
Control	16/08/2016	Parador del marqués	2 vasos de 250mL c/u	

Generación de librerías del gen marcador 16S rRNA

Se obtuvieron los amplicones correspondientes a las librerías del gen marcador 16S rRNA, los cuales fueron purificados y cuantificados para mandar a secuenciar (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación de ADN y producto de PCR de las librerías

Muestra	**Extracción de ADN (ng/µL)**	**Producto de PCR purificado (ng/µL)**
Tiempo 0	61.6	64.4
Tiempo 12	76.4	70.2
Tiempo 24	37.26	98.2
Tiempo 35	25.8	99.6
Control	48.7	71

Identificación taxonómica

Se obtuvieron un total de 97,851 secuencias, del total de éstas se identificaron 123 OTUs. Sin embargo, estudios han demostrado que si se utilizan las bases de datos "crudas" el error en la estimación es alto, por ende se ha propuesto filtrar las secuencias con respecto al porcentaje de abundancia, proponiendo 3 filtros, de 0.005%, 0.01% y 0.9%: en el primer y segundo caso se ocupan para estimar la diversidad real que está presente en las muestras, mientras que el último se utiliza para encontrar a la especies que se encuentren en todas las muestras [6], [7]. Una vez aplicando los 3 métodos de filtración de datos la tabla de OTUs se redujo a 32, 28 y 9 OTUs respectivamente. Con lo cual observamos que existen 9 especies presentes en todas las muestras. Los géneros que predominan son *Fructobacillus, Leuconostoc, Gluconoacetobacter, Sphingomonas* y *Vibrio*, principalmente. La abundancia de las mismas se puede observar en la siguiente gráfica:

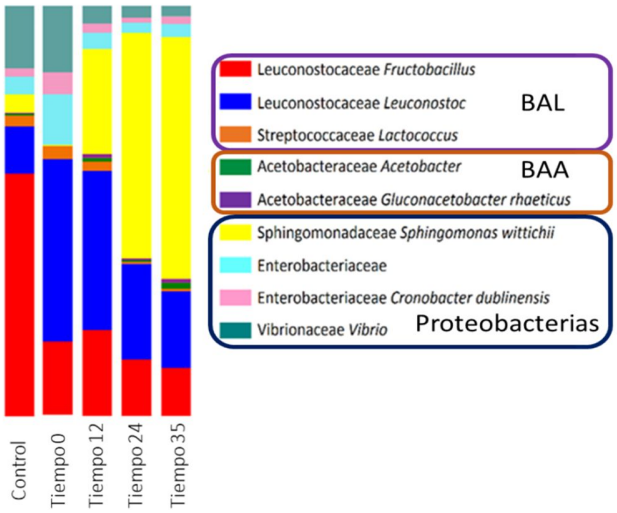


Figura 1. Identificación taxonómica. El tamaño de cada barra de color es proporcional a la abundancia de esa especie bacteriana.

Analizando a las 9 especies dominantes de las muestras encontramos que las ácido lácticas han sido reportadas como potenciales productoras metabolitos de diferente naturaliza con acción antimicrobiana, por ejemplo la producción de bacteriocinas probadas contra bacterias patógenas de humanos [8]. Otra función de importancia biotecnológica que presentan las bacterias ácido lácticas es la producción de folatos, los cuales tienen un impacto a nivel nutricional para el ser humano [9].

Otro microorganismo interesante es *Sphingomonas wittichii*, la cual es una bacteria de gran relevancia a nivel de bioremediación ya que tiene la capacidad de degradar xenobióticos [10]. A pesar de que hay bacterias asociadas a enfermedades, como es el caso del género *Vibrio*, existen reportes donde estos géneros son considerados "contaminantes" comunes de los productos fermentados, sin embargo, las abundancias de estos disminuyen conforme transcurre el tiempo de fermentación [11], (Figura 1).

CONCLUSIONES

Se concluye que la tuba guerrerense puede tener un efecto benéfico a la salud, promovido por las especies bacterianas identificadas durante el proceso de fermentación, no obstante, a pesar de estar presentes bacterias contaminantes, estas se encuentran en menor abundancia.

REFERENCIAS

[1] J. Tang, X. Tang, M. Tang, X. Zhang, X. Xu, and Y. Yi, "Analysis of the Bacterial Communities in Two Liquors of Soy Sauce Aroma as Revealed by High-Throughput Sequencing of the 16S rRNA V4 Hypervariable Region," vol. 2017, no. Figure 1, 2017.

[2] J. P. Tamang, K. Watanabe, and W. H. Holzapfel, "Review : Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages," vol. 7, no. March, 2016.

[3] A. Escalante, D. R. L. Soto, J. E. V. Gutiérrez, M. Giles-gómez, F. Bolívar, and A. López-munguía, "Pulque , a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage : Historical , Microbiological , and Technical Aspects," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. June, pp. 1–18, 2016.

[4] Z. Xu, M. A. Hansen, L. H. Hansen, S. Jacquiod, and S. J. Sórensen, "Bioinformatic Approaches Reveal Metagenomic Characterization of Soil Microbial Community," vol. 9, no. 4, 2014.

[5] M. A. Mohd Shaufi, C. C. Sieo, C. W. Chong, H. M. Gan, and Y. W. Ho, "Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses.," *Gut Pathog.*, vol. 7, p. 4, 2015.

[6] J. Kuczynski, J. Stombaugh, W. A. Walters, A. Gonzalez, J. G. Caporaso, and R. Knight, "Using QIIME to analyze 16s rRNA gene sequences from microbial communities," *Curr. Protoc. Microbiol.*, no. SUPPL.27, pp. 1–28, 2012.

[7] J. A. Navas-Molina, J. M. Peralta-Sánchez, A. González, P. J. McMurdie, Y. Vázquez-Baeza, Z. Xu, L. K. Ursell, C. Lauber, H. Zhou, S. J. Song, J. Huntley, G. L. Ackermann, D. Berg-Lyons, S. Holmes, J. G. Caporaso, and R. Knight, *Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME*. 2015.

[8] N. M. de la Fuente-Salcido, J. C. Castañeda-Ramírez, B. E. García-Almendárez, D. K. Bideshi, R. Salcedo-Hernández, and J. E. Barboza-Corona, "Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México," *Food Sci. Nutr.*, vol. 3, no. 5, pp. 434–442, 2015.

[9] M. Rossi, A. Amaretti, and S. Raimondi, "Folate Production by Probiotic Bacteria," pp. 118–134, 2011.

[10] A. T. M. Saeb, "Presence of Bacterial Virulence Gene Homologues in the dibenzo-p-dioxins degrading bacterium Sphingomonas wittichii," *Bioinformation*, vol. 12, pp. 241–248, 2016.

[11] S. H. Lee, J. Y. Jung, and C. O. Jeon, "International Journal of Food Microbiology Bacterial community dynamics and metabolite changes in myeolchi-aekjeot , a Korean traditional fermented fi sh sauce , during fermentation," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 203, pp. 15–22, 2015.

CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE UN QUESO DE ARO ELABORADO CON LECHE PASTEURIZADA BAJO CONDICIONES ESTANDARIZADAS.

*Jaimez-Ordaz, J., Hernández-Serna, Y., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., Añorve-Morga, J., González-Olivares, L.G. y Castañeda-Ovando, A.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, col. Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo. CP. 42180

*Autor para correspondencia: jjaimezordaz@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

En México, se producen al menos 40 variedades de quesos frescos genuinos, la mayoría a partir de leche cruda [1]. Uno de los primeros quesos definido como queso mexicano genuino, es el queso de aro. Se elabora utilizando leche cruda fluida, cuajo y sal por lo que es susceptible a una rápida descomposición, generando pérdidas económicas y posibles riesgos para la salud [2]. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente un queso de aro producido, bajo condiciones estandarizadas, con leche pasteurizada para compararlo con quesos de aro comerciales elaborados con leche cruda. Las variables controladas para la estandarización del proceso fueron estandarización de la leche (grasa, y sólidos totales), acidez, pasteurización de la leche, cortado, tiempo de agitado de la cuajada, contenido de sal y tiempo de prensado. Los parámetros físicos y químicos estudiados fueron color, forma, tamaño, peso, ancho y largo (Norma UNE-87-001-94), [3], humedad, acidez titulable y pH (normas FIL 78C:1991, ISO 5550:197; NOM-F-206-1986 y NMX-F-099-1970, respectivamente). La calidad microbiológica se determinó a través de la cuenta de bacterias coliformes en placa (NOM-113-SSA1-1994) y de bacterias mesófilas aerobias en placa (NOM-092-SSA1-1994). Una vez realizada la caracterización del queso de aro elaborado, los resultados se compararon con los obtenidos de muestras comerciales provenientes de 3 queserías ubicadas en diferentes municipios del estado de Hidalgo y Veracruz (Calnali y Huejutla, Hidalgo y Tempoal, Veracruz). Las condiciones estandarizadas para la elaboración del queso de aro fueron 3% grasa, 12-14% sólidos totales, 17-20°D, pasteurización a 63°C, 30 minutos, cortado en cubos de 3 cm^3, agitado 20 minutos a 38°C y salado en tina con 3-4% de sal. La forma, tipo de pasta y color fue similar en todos los quesos mientras que el peso, el ancho, la altura, la humedad, acidez titulable y pH presentaron diferencias significativas entre todas las muestras. La calidad microbiológica de los quesos de aro comerciales fue inadecuada, ya que presentó recuentos altos de coliformes totales (5.17-6.26 log UFC/g) y bacterias mesófilas aerobias (5.33-7.14 log UFC/g). No se observó crecimiento microbiano en las muestras de queso de aro elaborado a partir de leche pasteurizada y estandarizada y bajo condiciones de proceso controladas y las características fisicoquímicas que definen a este tipo de producto no se vieron afectadas. La información obtenida resultará útil para pequeñas y medianas empresas productoras de queso de aro con problemas en la optimización y conservación de su producto.

Palabras clave: Queso de aro; leche cruda; leche pasteurizada; estandarización.

REFERENCIAS

[1] Escoto, F. C., Vargas, A. C. y Villegas, A., Los quesos mexicanos genuinos: un saber que se debe rescatar y preservar. Congreso Internacional de la Red Sial Alimentación y Territorios. Universidad Internacional Andalucía. Jaen, España.

[2] Huerta, R. and Villegas, A., "Nature, evolution, contrast, and implications of imitations of genuine Mexican cheeses". *Estudios Sociales*, vol. 23, pp. 215-236, 2015.

[3] Chamorro, M. y Losada, M., *El análisis sensorial de los quesos*, 1a ed., Madrid, España: Mundi-Prensa, 2002.

QUALITY EVALUATION OF OIL FROM PUMPKIN SEEDS EXTRACTED BY ULTRASOUND.

Vazquez-Loera E.D, Perez-Lira J.A, *Suárez-Jacobo A, Garcia-Fajardo J.A, Orozco-Avila I.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. –Unidad Noreste Vía de innovación 404, PIIT, Autopista Monterrey-Aeropuerto Km.10 Apodaca, Nuevo León, 66629, México.

*Autor para correspondencia: asuarez@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

In Mexico, pumpkin crop has been used since prehispanic times. Pumpkin, maize and beans are the most important crops in our country's diet. Seeds contain polyunsaturated fatty acids like Omega 6 and Omega 9, vitamins A, C, E, potassium, fiber and iron. Traditionally, pumpkin seeds have been used to treat intestinal parasites, also Decrease inflammation in joints caused by arthritis. Oil from pumpkin seeds has been widely used in the treatment of prostatic hyperplasia, also helps to lower LDL cholesterol levels. In the present research work was evaluated the effect of oil extraction by different methods, particle size, time of extraction; then samples were analyzed the composition of fatty acids by Gas chromatography-mass spectrometry. The yield obtained by method of extraction: soxhlet (44%), and by ultrasound extraction time processing were: 10 minutes (30%), 5 minutes (27%), 2 minutes (25%) when two particle size were evaluated. Results obntained in FAMEs somposition ranged from: miristic acid C14:0 (0.12-0.17%), palmitic acid C16:0 (18.73-21.46%), stearic acid C18:0 (8.95-10.32%), oleic acid (& 9) C18:1 (35.67-40.18%), linoleic acid (& 6) C18:2 (30.64-32.52%), arachidonic acid C20:4 (0.21-0.31%), linolenic acid C18:3 (0.10-0.22%). This study shows that ultrasound assisted extraction is an efficient and solvent saving method for oil extraction and specifically could be an alternative option to obtain high quality pumpkin seed oil available for the mexican population.

Palabras clave: ultrasound oil extraction; pumpkin seeds oil; fatty acids.

REFERENCIAS

[1] Molina J.B, Venegas P. y Martínez-Correa H.A., 2016. Comparación entre métodos de extracción de aceite de semilla de zapallo (Curcubita mochata). Agronomía Colombiana 34(1Supl.), S588-S590.

[2] Espinosa-Solares T., Medina-Juárez L.A., Hueda-Rasgado E., Villanueva-Verduzco C., Montesinos-López O.A. y Gómez-Cruz A., 2010. Comparación de aceite de semilla de calabaza de tres especies y ocho aceites comerciales mediante un método multivariado. Ingeniería Agrícola y Biosistemas 2(2): 75-80.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE CEPAS RECONSTITUIDAS DE HONGOS COMESTIBLES *Pleurotus* Y *Lentinula* EN MEDIOS DE CULTIVO.

*[1]Valenzuela-Cobos, J.D., [2]Garín-Aguilar, M.E., [1]Sánchez-Hernández, A., [3]Leal-Lara, H., y [1]Valencia-del-Toro, G.

1. Laboratorio de Cultivos Celulares de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. UPIBI, Instituto Politécnico Nacional. Barrio la Laguna s/n Ticomán. Ciudad de México CP 07340, México.
2. Laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av de los Barrios No.1. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla CP 54090. Edo. de México, México.
3. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 Mexico D.F.

*Autor para correspondencia: juan_diegova@hotmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

Las cepas reconstituidas se obtuvieron por apareamiento de neohaplontes compatibles obtenidos por desdicariotización química de cepas parentales de *Pleurotus* y *Lentinula edodes*. El área de crecimiento de las cepas dicarióticas en EMA presentaron valores desde 25.04 a 57.89 cm^2. Por otro lado, el volumen de las cepas dicarióticas en grano de trigo presentaron valores de crecimiento variando de 38.09 a 80.54 cm^3. Los modelos matemáticos de Richards y Hills fueron utilizados para determinar los valores de μ_{max} y fase de latencia de todas las cepas dicarióticas, los valores de μ_{max} en EMA oscilaron entre 0.21 y 1.74 $día^{-1}$ y la fase de latencia entre 0.49 y 4.08 h, mientras que los valores de μ_{max} en grano de trigo fue desde 0.20 a 0.42 $día^{-1}$ y la duración de la fase de latencia se encontró en un intervalo desde 1.97 a 6.01 h.

Los resultados que se obtuvieron señalan que las cepas reconstituidas presentaron mayor μ_{max} y menor fase de latencia en ambos substratos en comparación a sus parentales, lo que abre la posibilidad de usar las cepas reconstituidas en lugar de las cepas de origen.

Palabras clave: Cepas reconstituidas; crecimiento micelial; modelo matemático; *Pleurotus*, *Lentinula edodes.*

INTRODUCCIÓN

A nivel global *Pleurotus* spp. y *Lentinula edodes* son la segunda y tercera especie de hongos con mayor producción(Royse, 2014) y se caracterizan por ser una gran fuente de proteínas y vitaminas (Manzi *et al*., 2001).

En la primera parte de este trabajo, obtuvimos cepas reconstituidas mediante el apareamiento de monocariones compatibles de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* y *Lentinula edodes*.

En la segunda sección de esta investigación, se calcularon la tasa de crecimiento y la cinética de crecimiento en EMA y grano de trigo de las cepas reconstituidas utilizando diferentes modelos matemáticos.

Esta investigación tuvo como objetivo principal evaluar mediante diferentes modelos matemáticos el crecimiento micelial en EMA y grano de trigo de las cepas reconstituidas de *Pleurotus* y *Lentinula edodes* en comparación con los parentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

En este estudio se utilizaron 2 cepas de *Pleurotus* spp., 1 cepa de *Lentinula edodes* y 3 cepas reconstituidas O_4xO_5, U_3xU_2, L_1xL_5 obtenidas por apareamiento de monocariones compatibles.

Producción de cepas reconstituidas mediante apareamiento de neohaplontes compatibles

Los neohaplontes tipo 1 se emparejaron con los monocariones tipo 2 de la misma cepa parental en todas las combinaciones posibles en placas Petri con EMA.

Medición de tasa de crecimiento micelial en EMA y grano de trigo

Para determinar el área de crecimiento micelial en EMA se utilizó la siguiente ecuación:

$A = \Pi r^2$

Para el volumen de crecimiento micelial se utilizó la siguiente fórmula:

$V = h\Pi r^2$

Las curvas de los gráficos del área y del volumen con respecto al tiempo se ajustaron a un modelo lineal (Guadarrama-Mendoza, 2013; Guadarrama-Mendoza *et al*., 2014).

Medición de cinética de crecimiento micelial

Para determinar la cinética de crecimiento micelial se utilizaron diferentes modelos matemáticos de Richards y Hills (Zwietering *et al*., 1990; Hills y Wright, 1994; Baty y Delignette-Muller, 2004)

-Modelo de Richards

$Y(t) = a\,[1 + v \,.\, \exp(k\,(T-x))]^{(-1/v)}$

-Modelo de Hills

$\lambda = [\ln(1+ (\mu_{max} / v)] / \mu_{max}$

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar la diferencia significativa con un nivel $p < 0{,}05$, el área y volumen de crecimiento micelial, la velocidad específica de crecimiento máximo (μ_{max}) y la duración de la fase lag (λ). Adicional se realizó la prueba de Duncan con $\alpha = 0.05$ para encontrar entre cuales de estas existen diferencias estadísticas. Los análisis se realizaron con el software estadístico Statgraphic ver. 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de cepas reconstituidas

Los componentes monocarióticos obtenidos a partir de las cepas parentales formaron 3 cepas reconstituidas mediante el aparente de los neohaplontes tipo 1 con los monocariones tipo 2 de cada cepa.

Área y volumen de crecimiento micelial en EMA y grano de trigo

Las cepas parentales en EMA mostraron valores de área de crecimiento entre 25.04 a 50.28 cm^2, mientras que las cepas reconstituidas presentaron valores desde 28.42 a 57.89 cm^2 en el 8^{vo} día. Por otro lado, las cepas parentales en grano de trigo presentaron valores de crecimiento de 38.09 a 58.61 cm^3, mientras que las cepas reconstituidas mostraron valores entre 43.11 y 80.54 cm^3 en el 8^{vo} día (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de crecimiento micelial para cepas parentales y reconstituidas en EMA

Cepas	Área de crecimiento (EMA) (cm^2)	Volumen de crecimiento (grano de trigo) (cm^3)
POS	50.28±1.56^{e}	52.16±3.43^{b}
UTMR	34.92±0.54^{c}	58.61±0.19^{c}
LC	25.04±3.07^{a}	38.09±1.87^{a}
O_4xO_5	58.61±0.87^{e}	69.54±2.41^{d}
U_3xU_2	46.91±0.74^{d}	80.54±4.52^{e}
L_1xL_5	28.42±0.19^{b}	43.11±1.43^{b}

* Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas entre los valores de los tasas de crecimiento con nivel p <0,05, según la prueba de Duncan, n = 10.

Velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) en EMA y grano de trigo

Las cepas dicarióticas utilizando el modelo de Richards presentaron μ_{max} en EMA desde 0.21 a 1.74 $día^{-1}$ y en grano de trigo entre 0.20 a 0.42 $día^{-1}$ (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los valores de la velocidad específica de crecimiento máximo (μ_{max}) de las cepas dicarióticas en EMA y grano de trigo

Cepas	Modelo de Richards	
	μ_{max} (EMA) ($día^{-1}$)*	μ_{max} (grano de trigo) ($día^{-1}$)*
POS	0.95±0.11^{c}	0.28±0.00^{b}
UTMR	0.86±0.02^{c}	0.30±0.05^{c}
LC	0.21±0.13^{a}	0.24±0,08^{a}
O_4xO_5	1.74±0.26^{c}	0.35±0.06^{d}

U_3xU_2	0.73±0.02[b]	0.42±0,15[d]
L_1xL_5	0.33±0.10[a]	0.20±0.02[b]

* Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas entre los valores de los parámetros con nivel p <0,05, según la prueba de Duncan, n = 10.

Tiempo de duracón de fase lag (λ) en EMA y grano de trigo

La Tabla 3 indica que las cepas dicarióticas utilizando el modelo de Richards presentaron valores de λ en EMA desde 0.49 a 4.08 h y en grano de trigo entre 1.97 a 6.01 h.

Tabla 3. Comparación de los valores de duración de fase latencia (λ) de las cepas dicarióticas en EMA y grano de trigo

Cepas	**Modelo de Hills**	
	$\lambda_{(EMA)}$ (h)*	**$\lambda_{(grano\ de\ trigo)}$ (h)***
POS	0.73±0.18[a]	3.42±0.02[c]
UTMR	1.15±0.13[b]	3.19±0.49[b]
LC	4.08±1.54[d]	6.01±0.45[e]
O_4xO_5	0.49±0.24[a]	2.95±0.24[b]
U_3xU_2	0.92±0.02[a]	1.97±0.08[a]
L_1xL_5	2.05±0.86[c]	4.57±0.32[d]

* Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas entre los valores de los parámetros con nivel p <0,05, según la prueba de Duncan, n = 10.

CONCLUSIONES

Los resultados pueden inferir que el vigor del micelio de las cepas reconstituidas puedan ser utilizadas en la industria cuando el micelio de las cepas parentales pierde su poder para invadir los sustratos.

REFERENCIAS

[1] F. Baty, and M.L. Delignette-Muller, "Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?," *International journal of food microbiology* , vol. 91, no. 3, pp. 261-277, 2004.

[2] P. C. Guadarrama-Mendoza, G. Valencia del Toro, R. Ramírez-Carrillo, F. Robles-Martínez, J. Yáñez-Fernández, M.E. Garín-Aguilar, and G. Bravo-Villa, "Morphology and mycelial growth rate of Pleurotus spp. strains from the Mexican mixtec region," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 45, no. 3, pp. 861-872, 2014.

[3] C.P. Guadarrama-Mendoza, "Evaluación de la productividad y caracterización de los hongos comestibles del género *Pleurotus* spp. de la región Mixteca," Ph.D. thesis, Instituto Politécnico Nacional, México. D. F., 2013.

[4] B. P. Hills, and K.M. Wright, "A new model for bacterial growth in heterogeneous systems," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 168, no. 1, pp. 31-41, 1994.

[5] P. Manzi, A. Aguzzi, and L. Pizzoferrato, "Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy," *Food Chemistry*, vol. 73, no. 3, pp. 321-325, 2001.

[6] D.J. Royse, "A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*", in Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), 2014, pp. 1-6.

[7] M.H. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts and K. Van'triet, "Modeling of the bacterial growth curve," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, pp. 1875– 1881, 1990.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO DE MEZCLAS PARA LA OBTENCIÓN DE UN ALIMENTO EXTRUIDO, APROVECHANDO LOS RESIDUOS DEL MANGO.

[1]Medina-Rendon, E.A., [1]Arriola-Guevara, E., [2]Guatemala-Morales, G.Ma., [2]Fernandez-Flores, O., [2]Espinosa-Andrews, H., [2]Morales-Hernández, N. y [2]Beltrán-Médina, E.A.

1 Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierias, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino Garcia Barragan No. 1421, Guadalajara, Jal, 44430.
2 Unidad de Tecnologia Alimentaria, Centro de Investigacion y Asistencia en Tecnologia y Diseño del Estado de Jalisco A.C, Av. Normalistas # 800, Colinas de la Normal, Guadalajara, Jal, 44270.

*Autor para correspondencia: es_ebeltran@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN
Se elaboró un alimento extruido con base de harina de maíz blanco (Zea mays L.) y adicionado con residuos de cáscara y almendra del mango. El mango utilizado fue Mangifera indica variedad Tommy Atkins, la cáscara y la almendra del mango se secaron en un horno de convección a una temperatura de 60 °C, durante 22 horas para la cáscara y, 11 horas para la almendra. Ambas, se molieron hasta obtener un tamaño de partícula promedio de 0.50 mm para la cáscara y de 0.40 mm para la almendra [1,2]. Una vez obtenidas las harinas se realizó un diseño de mezclas simple lattice ampliado con 14 puntos, donde los componentes fueron harina de cáscara de mango (25-75%), harina de almendra de mango (0-50%) y harina de maíz blanco (25-75%), siendo las variables de respuesta el índice de expansión, el Índice de Solubilidad en Agua (ISA) y el Índice de Absorción en Agua (IAA). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.06. El IAA e ISA se calcularon utilizando el método reportado por Anderson, et al. en 1969 [3], el índice de expansión se calculó al dividir el diámetro del extruido entre el diámetro de la boquilla. La extrusión se llevó a cabo en un equipo Brabender 20:1 L/D (Intelli-Torque Plasti-Corder®), con tornillo simple de relación de compresión 3:1; las condiciones de extrusión fueron: velocidad de rotación de 100 rpm, temperatura de 120°C, humedad de 17%, velocidad de alimentación de 20 g/min y boquilla de 3 mm. El análisis estadístico del diseño de mezcla nos arroja dos zonas de estudio principales una cercana al vértice correspondiente a maíz al 75%, cáscara al 25% y almendra al 0% y la segunda cerca del vértice que corresponde a maíz al 25%, cáscara al 75% y almendra al 0. La mezcla seleccionada como la mas adecuada a las condiciones establecidas, fue la de 25% maíz, 75% cáscara y 0% almendra, debido a que cumple con los requerimientos nutricionales. Cuyos resultados fueron: IAA (5.78 g gel/g muestra), ISA (31.51%) y un índice de expansión de (1.05), lo que nos indica que puede ser utilizado como un alimento para cereal de desayuno.

Palabras clave: Key words: mango; hot water; calcium salts; chilling injury.

REFERENCIAS

[1] Chaparro Acuña A. E., Lara Sandoval, A., Sandoval Amador, S. J., Sosa Suarique, J. J., Martínez Zambrano, J. H. Gil González. Caracterización funcional de la almendra de las semillas de mango (Mangifera indica L.). Revista Ciencia en Desarrollo, vol. 6, no. 1, pp. 67-75, 2015.

[2] Noor, A., Lee, W. y Bhat, R. Nutritional and sensory quality evaluation of sponge cake prepared by incorporation of high dietary fiber containingmango (Mangifera indica Var. Chokanan) pulp and peel flours. International journal of Food Sciences and Nutrition, vol. 62, no. 6, pp. 559-567, 2011.

[3] Anderson, R. A., H. F. Conway, V. F. Pfeifer, and E. I. Griffin. Roll and Extrusion Cooking of Grain Sorghum Grits. Cereal Science Today, vol. 14, pp. 372-375, 1969.

CARACTERIZACIÓN DE ALIMENTOS EXTRUDIDOS TIPO BOTANA OBTENIDOS MEDIANTE UN DISEÑO DE MEZCLAS.

[1]Gutiérrez-Ramírez, A.M., [1]Arriola-Guevara, E., [2]Guatemala-Morales, G.M., [2]Morales-Hernández, N., [1]Mondragón-Cortés, P.M. y [2]Beltrán-Medina, E.A.

1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino Barragán #1421, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44430, México.
2. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Av. Normalistas #800, Guadalajara, Jalisco C.P. 44270, México.

*Autor para correspondencia: es_ebeltran@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN
En este trabajo se realizó la caracterización de las harinas utilizadas para la elaboración de una botana extrudida con alto contenido proteico, formulada a base de harinas de maíz morado (HMM), harina de chícharo (HC) y salvado de avena (SA); se analizó los efectos de las proporciones de las materias primas mediante un diseño de mezclas, el cual nos dio como resultado las siguientes proporciones de las materias primas: HMM (70-92%), HC (4-26%) y SA (4-26%), se estableció el contenido de humedad de 15%, las condiciones de extrusión utilizadas fueron temperatura del cabezal 90ºC y velocidad de husillo 140 rpm, la caracterización de las propiedades fisicoquímicas del alimento extrudido fueron: el índice de absorción de agua (IAA), el índice de solubilidad en agua (ISA), la dureza, la fragilidad, el índice de expansión (IE) y la densidad aparente además de la energía mecánica específica. La formulación que presento las mejores características tanto de dureza y expansión fue la mezcla con 81% HMM, 15% HC y 4% SA.

Palabras clave: Diseño de mezclas; botana; extrusión

REFERENCIAS

[1] Anderson, R., Conway, H.F., Pheiser, V.F., Griffin, E.L. 1969. "Gelatinization of corn grifts by roll and extrusion cooking". Cereal science today. 14,
[2] Ramírez - Wong B., Sweat V.E., Torres P.I., Rooney L.W. 1994. "Cooking time, grinding, and moisture content effect on fresh corn masa texture". Cereal chemistry (USA). 71, 337-343.
[3] Pérez-Navarrete, C., Cruz E., Chel G., Betancur-Anaconda, D., 2006. "Caracterización física de extruidos preparados con mezclas de harinas de maíz QPM (Zea mays L.) y frijol lima (Phaseolus lunatus L.) Revista Mexicana de Ingeniería Química. 5, 145-155.

CARACTERIZACIÓN DE ALMIDÓN DE MUSA SP. OBTENIDO MEDIANTE MÉTODO DE EXTRACCIÓN VERDE.

[1]Polanco-Lugo, E., [1,2]Rizo-Tafolla, E., [1]Martínez-Castillo, J., [1]Pacheco-López, N. y [1]Ayora-Talavera, T.

1. Centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad Sureste. Parque Científico Tecnológico de Yucatán, km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Mérida, Yucatán.
2. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de la Piedad.

*Autor para correspondencia: erikpolanco@hotmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El almidón es una biomolécula de origen agroalimentario con innumerables ventajas: es abundante, renovable, biocompatible, biodegradable, y se puede aislar a un costo relativamente bajo a partir principalmente de cereales, tubérculos y leguminosas. Sin embargo, el incremento en la demanda del almidón de fuentes convencionales para el desarrollo de nuevos productos ha motivado la búsqueda de fuentes alternas. Entre los principales productos frutícolas en México, el plátano de cocción con 2.4 millones de toneladas cosechadas por año, constituye una fuente importante de este polisacárido y una oportunidad de estudio para potenciar futuras aplicaciones en el campo de la industria alimentaria. El objetivo del presente trabajo fue evaluar su aislamiento mediante un método de extracción de química verde, y caracterizar sus propiedades físicas, químicas y funcionales que permitan la consideración de su potencial empleo. La caracterización física del fruto se realizó a partir de la firmeza de la pulpa mediante un analizador de textura presentando valor promedio de 10.60 ± 0.94 N, y color de la cáscara con valores de L*= 52.32, a*= -7.93 y b*= 39.15 de acuerdo a la escala CIELab. Estos valores sugieren un estado de madurez no superior a 24 h después de su cosecha. La obtención del almidón nativo se realizó a partir de fraccionamiento húmedo previo tratamiento con solución antipardeamiento ($C_6H_8O_7$ al 1%) [1]. El rendimiento fue de 19.25±0.78% bs, y el tamaño del gránulo fue menor a 147 micras. El contenido de almidón total fue 96.48±0.28% bs, y presentó índice de blancura de 90.63±3.64%. La proteína cruda, el material graso y el material inorgánico fueron del orden de 1.43±0.15, 0.96±0.06, y menor al 0.12% bs, respectivamente. El contenido de humedad (12.19±0.28) sugiere un proceso de secado óptimo, así como una larga vida de anaquel bajo condiciones de almacenamiento apropiadas. Mientras que el pH (6.62) y la acidez titulable (0.005%) fueron acordes con lo reportado en la literatura. Los valores de solubilidad, poder de hinchamiento y capacidad de absorción de agua determinados a 50, 60, 70, 80 y 90°C, presentaron valores en un intervalo entre 1.43-16.26, 2.61-16,79, y 2.58-14.06%, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que el almidón nativo extraído es de calidad óptima de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas evaluadas.

Palabras clave: Almidón; plátano de cocción; propiedades fisicoquímicas; propiedades funcionales.

REFERENCIAS

[1] Alemán, S.E., Ramírez, A.O., Manzanilla, E.E., Guzmán, R.E. and Pérez, E.E.(2015). Functional and nutritional characterization of native and modified starches from bananas hybrids. Starch/Starke, 67 (5-6), pp 459-469. Doi:10.1002/star.201400160.

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MANZANILLA OBTENIDOS MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y LIXIVIACIÓN CON SOLVENTES.

[1]Rodríguez-Valadez, M. y [2]Castillo-Herrera, G.A.

1. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle. Zapopan, Jalisco.
2. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Tecnología alimentaria. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal. Zapopan, Jalisco.

*Autor para correspondencia: rvmonica94@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

La manzanilla es una planta perenne perteneciente a la familia Astraceae. Se puede encontrar de manera silvestre y como cultivo en Europa, América del Norte y el norte de África [1]. Tradicionalmente se le atribuyen propiedades antisépticas, antibióticas, bactericidas y antioxidantes, por lo que ha sido utilizada durante siglos en la medicina tradicional e incluso se le puede encontrar en la Farmacopea de los Estados Unidos y en la Farmacopea Británica [2]. Es por esto que obtener extractos de manzanilla con alta calidad resulta de interés para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. En el presente trabajo se revisan tres métodos diferentes para la obtención de extractos de manzanilla: el método de arrastre de vapor, la extracción por lixiviación y la extracción con CO2 supercrítico. Se comparó la actividad antioxidante de los extractos mediante los ensayo con ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etillbenzotiazolin-6-sulfonico)) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), así como el contenido total de fenoles y flavonoides. Como resultado se obtuvo que el método de extracción con mejor actividad antioxidante y mayor contenido de fenoles y flavonoides es el obtenido por lixiviación con agua durante 3 horas a 25ºC en una relación (manzanilla/agua) 1:10, permitiendo obtener una actividad antioxidante equivalente a 142.1626 g de Trolox por el ensayo DPPH, 82.9 g de Trolox por el ensayo de ABTS y un contenido de fenoles de 75.7210 g equivalentes de Ácido Gálico y flavonoides de 664.4 g equivalentes de Quercetina.

Palabras Clave: Manzanilla; ABTS; DPPH; Fenoles; Flavonoides; Antioxidantes.

REFERENCIAS

[1] R. Guimarães et al., "Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations," Food Chem., vol. 136, no. 2, pp. 718–725, Jan. 2013

[2] B. Avula et al., "Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and use of partial leastsquare discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile/Chrysanthemum flower heads," J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 88, pp. 278–288, Jan. 2014.

AMARANTO: ALTERNATIVA PRODUCTIVA EN ELVALLE DEL MEZQUITAL, HIDALGO.

[1]Callejas-Hernández, J., [2]Hernández-Guzmán, F.J., [1]Rodríguez-Ortega, A., [1]Cruz-Vera, I., [1]Landero-Valenzuela, N., [1]Lara-Viveros, F.M. y [3]Bustamante-Espinosa, L.V.

1. Ingeniería en Agrotecnología, 2 Ingeniería en Producción Animal.
2. Tepatepec, Francisco I. Madero; Hidalgo, México. 42660.
3. Ingeniería Civil, Universidad Politécnica de Francisco I Madero, Carretera Tepatepec-San Juan Tepa, Km

*Autor para correspondencia: judith_callejas@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Alimentos.

RESUMEN
El amaranto es un cultivo milenario, originario de Mesoamérica, las civilizaciones precolombinas, lo consumían en igual importancia que el maíz y el fríjol [1,2]. El grano se caracteriza por su alto valor nutritivo en sus múltiples aplicaciones por ello se propone como una alternativa de cultivo en el Valle del Mezquital, Hidalgo. En el trabajo se evaluó el rendimiento y la calidad de semillas en dos variedades de amaranto. El cultivo se estableció el 21 de junio con las variedades Nutrisol y Revancha, los tratamientos consistieron en la aplicación de micorrizas y sin ellas al momento de la siembra; se cosechó a los 150 dds, las panículas se dejaron secar a temperatura ambiente para extraer la semilla con mayor facilidad. Se limpió la semilla y se analizó el % de pureza, tamaño, humedad, peso volumétrico, peso 1000 semillas, conductividad eléctrica, % de germinación y rendimiento. Se observó mayor rendimiento de semilla en la variedad Nutrisol (4274 kg ha -1) en comparación con Revancha (1514 kg ha -1) cuando se trabaja con micorrizas, mientras que de no hacerlo el rendimiento disminuye significativamente para ambas variedades, 3264 kg ha -1 y 1188 kg ha -1 respectivamente.

Palabras clave: Amaranto; Micorrizas; Rendimiento.

REFERENCIAS
[1] J. C. Morales Guerrero, N. Vázquez Mata y R. Bressani Castignoli, El Amaranto características y aporte nutricional., 2a. ed., Trillas, 2008.
[2] E. Espitia Rangel, D. Escobedo López, C. Mapes Sánchez, A. V. Ayala Garay, P. Rivas Valencia, G. Martínez Trejo y M. De la O Olán, «Conservación de los recursos genéticos de amaranto (Amaranthus),» DE-HUAUHTLI- A-AMARANTHUS- PASANDO-POR-ALEGRIA, México, 2010.

EXPLORACIÓN DE LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL EN LA NATA SUPERFICIAL FORMADA EN TANQUES DE ALMACENAMIENTO DE "ORDINARIO".

*Estarrón-Espinosa, M., López-Ramírez, J.E.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Unidad de Tecnología Alimentaria, Camino el Arenero 1227, Col. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México 45019.

*Autor para correspondencia: mestarron@ciatej.mx

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El proceso de elaboración del tequila, bebida distintiva de México, implica una doble destilación, que enriquece el etanol y depura los compuestos volátiles que lo caracterizan. En la primera destilación se obtiene el *ordinario* con una graduación alcohólica entre 20-30% alc. vol. El *ordinario* es nuevamente destilado para obtener el "rectificado" con una graduación entre 38-60 % alc. vol. y da origen al tequila blanco después de algunas operaciones de acondicionamiento. Dado su baja graduación alcohólica y sin una depuración fina que remueva componentes que puedan alterar la estabilidad del producto, el *ordinario* almacenado puede formar una capa superficial sólida que contiene componentes que podrían alterar la calidad del producto terminado. En este trabajo se realizó una exploración de la composición volátil en la película superficial formada en el tanque de almacenamiento de *ordinario* expuesto a baja temperatura. Mediante el acople cromatografía de gases-espectrometría de masas se detectaron 101 componentes volátiles pertenecientes a diferentes grupos funcionales. Cuantitativamente predominaron los ésteres, ácidos e hidrocarburos alcanzando concentraciones de 27,780; 6,950 y 1,847 mg/100 ml respectivamente. La presencia de estos compuestos en el tequila debido a una deficiente depuración durante la rectificación y/o el acondicionamiento, pueden propiciar defectos de turbidez en el producto terminado.

Palabras clave: Ordinario; turbidez; tequila; volátiles; ácidos grasos

INTRODUCCIÓN

El tequila es la bebida alcohólica distintiva de México producida a partir de los jugos fermentados de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Su producción involucra diversas etapas: jima del agave; cocimiento de las piñas seguido de la molienda para la extracción de los jugos (proceso tradicional) o bien desgarrado del agave crudo, extracción de sus jugos y posterior hidrólisis; fermentación y finalmente la destilación [1, 2]. En el proceso del tequila, se efectúa una destilación diferencial en dos etapas. En la primera etapa conocida como "destrozamiento", se obtiene un destilado denominado *ordinario* cuyo grado alcohólico oscila entre un 20 y 30% alc. vol. En la segunda etapa, conocida como "rectificación", se concentra el alcohol del *ordinario* y se obtiene el *rectificado* o *corazón* con una graduación entre 38 y 60 % alc. vol. Durante la destilación y aún durante las operaciones de acondicionamiento de la bebida previo a su envasado, se separan tanto los componentes volátiles deseables que darán el carácter sensorial al tequila, como los que pueden ocasionar problemas en su calidad; entre éstos últimos

destacan algunos ácidos grasos y sus ésteres, los cuales si bien aportan características sensoriales al tequila, en altas concentraciones pueden ocasionar problemas de estabilidad en el producto almacenado a bajas temperaturas [3, 4].

Para evitar estos problemas, algunas empresas enfrían previamente el destilado a -10°C para forzar principalmente la fusión de las ceras, terpenos y ácidos grasos, compuestos a los que se adjudica la turbidez, y posteriormente se filtra. Sin embargo, cuando en las diferentes regiones de producción prevalecen bajas temperaturas durante un tiempo prolongado, en los tanques de almacenamiento de *ordinario* e incluso de *rectificado*, pueden llegar a formarse precipitados o una capa superficial conteniendo algunos componentes que podrían alterar la calidad del producto terminado. Basado en este hecho, el objetivo de este trabajo fue realizar una exploración de la composición volátil en la película o nata superficial formada durante el invierno en el tanque de almacenamiento de *ordinario* de una empresa tequilera, e identificar los compuestos que potencialmente propician turbidez en los destilados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de la muestra

La muestra de *ordinario* (producto de la primera destilación), fue muestreada de su tanque de almacenamiento y proporcionada por una empresa tequilera de la zona metropolitana de Guadalajara. La muestra fue extraída en un sistema líquido-líquido en lote con diclorometano y finalmente concentrada a 5 ml en un equipo Kuderna-Danish.

Determinación de los componentes volátiles

Los componentes volátiles extraídos de la muestra, se analizaron en un sistema GC-HP 5890 Series II acoplado a un espectrómetro de masas HP 5972 provisto de un inyector automático. A través del inyector a 230°C, se introdujeron 0.5 µl de muestra cuyos componentes fueron separados en una columna HP-INNOWAX de 60m x 0.250 mm ID x 0.25 µm ft, con un flujo de 0.8 ml/min de He como gas acarreador. La temperatura inicial del horno fue de 40°C durante 10 min, después se elevó a 240°C con incrementos de 3°C/min manteniendo 40 min. El detector operó a 70 eV a una temperatura de a 260°C en modo IE. La identificación tentativa de los componentes separados se realizó en base a la comparación de espectros de cada pico detectado en la muestra con los de las bibliotecas de espectros Wiley 275L y NIST05L, y cuando fue posible, comparando los tiempos de retención de compuestos puros. La cuantificación se efectúo en base al área integrada de los pico en la muestra con respecto a la respuesta de estándares de referencia de concentración conocida en inyecciones independientes. La muestra se analizó por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los componentes en la nata

Bajo las condiciones analíticas descritas, se detectaron 101 componentes volátiles en la nata del *ordinario*, los cuales fueron clasificados en los diferentes grupos funcionales resumidos en la Tabla 1. En número de compuestos identificados, así como en concentración, los ésteres fueron el grupo más abundante con 27780.8 mg/100ml. Le siguió el grupo de ácidos con 6950.7 mg/100ml y finalmente el grupo de hidrocarburos con una concentración de 1847.9 mg/100ml, Figura 1.

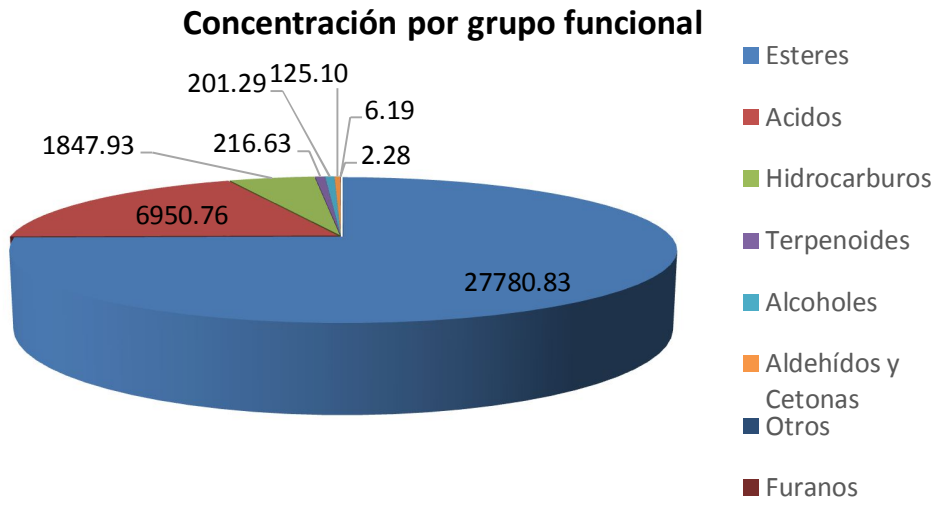


Figura 1. Proporción de los compuestos detectados en nata superficial de *ordinario*.

Concentraciones menores de furanos, componentes misceláneos, aldehídos y cetonas, alcoholes y terpenoides, igualmente fueron cuantificadas en la nata superficial en concentraciones de 2.28, 6.19, 125.10, 201.29 y 216.63 mg/100ml, respectivamente. De manera particular, en esta muestra, los etil ésteres más abundantes tuvieron cadenas de carbono par desde C_{10} a C_{18}, siendo el hexadecanoato, decanoato y dodecanoato de etilo los de mayor concentración. Por otra parte, los ácidos grasos que presentaron mayor concentración en la muestra fueron de cadenas de carbono de C_8 a C_{18}, destacando la concentración de los ácidos tetradecanoico, decanoico, dodecanoico y hexadecanoico. Estos ácidos grasos y sus ésteres etílicos, lo mismo que algunos hidrocarburos y componentes terpénicos ya han sido identificados en jugo extraído de cabezas de *Agave tequilana* Weber crudo, por lo que su origen estaría asociado a la materia prima utilizada en la elaboración del tequila [4]. Sin embargo algunos estudios refieren la formación de algunos ésteres durante la destilación mediante reacciones de esterificación favorecidas en un pH ácido, que involucran un ácido orgánico y un alcohol, por lo que la ocurrencia de esta reacción en la matriz compleja del mosto tequilero fermentado y del *ordinario* en ebullición, son favorables liberando estos componentes al destilado [3].

Se encontró coincidencia en la alta concentración, principalmente de ácidos grasos y ésteres etílicos, en la muestra extraída del tanque de almacenamiento de *ordinario* y el señalamiento que el sector tequilero hace sobre el problema de turbidez y precipitación de algunos aglomerados asociados a estos compuestos. Sin embargo, debido a la variabilidad de la materia prima (madurez y origen del agave, altura de la jima), prácticas de extracción de jugos, hidrólisis, fermentación y técnica de destilación utilizada durante los procesos de elaboración del tequila, la concentración de estos componentes y otros asociados a problemas de estabilidad (turbidez) de los productos, serán variables y para evitarlos cada empresa pondrá en marcha diferentes estrategias para su reducción y/o eliminación.

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados en la nata formada en el tanque de *ordinario*

Compuesto	Conc. mg/ 100 ml	Compuesto	Conc. mg/ 100 ml	Compuesto	Conc. mg/ 100 ml
Ésteres		***Ésteres***		***Terpenoides***	
Etil hexadecanoato	7281.1	Propil octanoato	2.4	alfa-Copaeno	9.7
Etil dodecanoato	4665.9	Metil octanoato	2.2	alfa-Terpineol	7.4
Etil decanoate	3676.3	Octil acetato	1.9	Linalool	3.2
Etil tetradecanoato	2271.7	Etil propionato	0.7	alfa-Curcumeno	2.4
Etil 9-hexadecanoto	2005.8	***Ácidos***		p-Cymeno	2.2
Etil linoleato	1906.8	Ac. hexadecanoico	2767.0	alfa-Longipinene	1.8
Etil octadecanoato	940.7	Ac. dodecanoico	1269.2	Óxido de linalol	1.8
Isoamil decanoato	830.5	Ac. decanoico	999.3	Isoterpinolene	1.8
Etil oleato	707.0	Ac. tetradecanoico	740.1	Limonene	0.9
Etil Heptadecanoato	580.5	Ac. 9-Hexadecenoico	466.0	***Alcoholes***	
Etil pentadecanoato	490.4	Ac. linoleico	219.3	Alcohol fenetilico	92.7
Isoamil dodecanoato	420.4	Ac. Octadecanoico	187.2	Alcohol isoamilico	85.9
Etil linolenato	355.5	Ac. octanoico	171.6	Isobutanol	15.1
Etil octanoato	284.1	Ac. pentadecanoico	65.3	1-Octanol	2.7
Fenetil isovalerato	267.4	Ac. Oleico	59.7	1-Propanol	2.5
Fenetil isovalerato	246.3	Ac. acético	6.2	1-Pentanol	2.5
Propil dodecanoto	164.0	***Hidrocarburos***		***Aldehídos y Cetonas***	
Isoamil octanoato	158.6	*1-Tetradeceno*	822.7	Hexanal	45.2
Isobutil decanoato	110.7	*1-Hexadeceno*	777.1	(E,E) 2-4-Decadienal	40.5
Isobutil decanoato	105.5	*N.I*	105.9	N.I	11.1
Etil tridecanoato	79.5	*Eicosano*	35.7	2-Butanona	5.4
Decil acetato	35.3	Hexadecano	28.0	2-Octenal	4.7
Etil undecanoato	33.5	Tetradecano	25.7	Propanal	4.1
Propil decanoato	27.1	*N.I*	15.9	2-Heptenal	3.6
Etil-9-decanoato	25.5	Pentadecano	9.9	Acetaldehido	2.6
Etil nonato	25.1	*N.I*	6.3	Pentana	2.0
Metil dodecanoato	19.8	Heptadecano	6.1	3-Octen-2-ona	1.9
Isobutil octanoato	12.1	Tridecano	4.1	Octanal	1.5
Isoamil acetato	9.2	Octadecano	3.4	2-Propanona	1.3
Metil decanoate	9.1	Dodecano	3.4	Heptanal	1.2
Fenetil propanoato	6.7	Fitano	3.0	***Otros***	
Etil acetato	6.2	Undecano	0.8	Hexanal dietil acetal	3.5
Etil hexanoato	5.5	***Terpenoides***		Vitispirano	2.7
Etil heptanoato	3.5	Nerolidol	122.6	***Furanos***	
Etil formato	3.2	Ciclosativeno	53.1	5-Metil furfural	1.3
4-Metil heptadecano	3.0	alfa Murolene	9.8	2,5-Dimetilfuran	1.0

N.I: Compuesto no identificado.

CONCLUSIONES

En este trabajo se identificaron los principales ácidos grasos, ésteres e hidrocarburos que solidifican en el *ordinario* a bajas temperaturas. La presencia de estos compuestos en el tequila debido a una deficiente depuración durante la rectificación y/o el acondicionamiento, son entre otros, los responsables de propiciar defectos de turbidez en el producto terminado expuesto o almacenado a bajas temperaturas.

REFERENCIAS

[1] M. Cedeño Cruz, "Tequila Production", *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 1-11, 1995.

[2] F. J. Pérez Martínez et al., *Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas*, 2ª ed., Guadalajara, Jal. México, 2015, ch. 3: Extracción del Jugo de Agave, pp. 55-95.

[3] R. Prado Ramírez, *Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas*, 2ª ed., Guadalajara, Jal. México, 2015, ch. 5: Destilación, pp. 181-230.

[4] M. Estarrón Espinosa et al., *Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas*, 2ª ed., Guadalajara, Jal. México, 2015, ch. 6: Calidad del Tequila: Marco Normativo y Composición del Producto, pp. 231-319.

RESIDUES OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES IN FRUITS OBTAINED FROM MARKETS AND SUPERMARKETS IN CARTAGENA CITY, (COLOMBIA).

Jaramillo-Colorado, B.E., Palácio- Herrera, F.M.

Agrochemical Research Group, Faculty of Exact and Natural Sciences, University of Cartagena, Cartagena, Bolivar, Colombia.

*Autor para correspondencia: fmpe_06@hotmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

Organophosphorus pesticides are widely applied in agriculture. Organochlorine pesticides were banned in Colombia various decades ago. OPs are sprayed over crops or soils, causing residues to be found in surface and groundwaters, fruits, vegetables and in drinking water. Pesticides in fruits guzzling was held in the city of Cartagena de Indias, Colombia, such as mango, guava and papaya, which were collected at different sites selling (market square and supermarkets in the city). The separation and identification of organophosphorus compounds was performed by gas chromatography coupled to flame ionization detectors (FID) and mass spectrometric (MSD). Pesticides play a key role in modern agriculture for the control of pests that threaten our crops. In many cases, productivity levels and the profitability of a single crop can be applied through the application of pesticides. Often, however, the misuse of these pesticides poses a threat to farmers who apply pesticides, to consumers of agricultural products and to the environment. The presence of chlorpyrifos, Disulfoton and Anzinfosmethyl was confirmed. Concentration ranges of OPs found in samples Mangifera indica (mango) were: disulfoton (4.19 to 5.88 ppm); chlorpyrifos (ND-10, 35 ppm); azinphosmethyl (1.60 to 12.10 ppm). For Carica papaya (papaya): disulfoton (ND-2.48 ppm); chlorpyrifos (not detected); azinphosmethyl (0.61 to 1.95). Psidium guava (guava): disulfoton (0.82 to 2.0 ppm); chlorpyrifos (not detected); azinphosmethyl (not detected).

Palabras clave: tropical fruits, organophosphorus pesticides, gas chromatography.

BUSQUEDA DE ANTIMICROBIANOS EN MICROORGANISMOS AISLADOS DEL QUESO TIPO CHIAPAS.

[1]Cortés-Culebro, D.N., [1]González-González, C.R., [2]Beltrán-García, M.J.

1. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan.
2. Departamento de Química-ICET, Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor para correspondencia: danianoemicortes@gmail.com

Área del conocimiento: Alimentos

RESUMEN

El queso tipo Chiapas, queso Crema tropical o queso doble crema; es un producto lacteo ampliamente consumido en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz. El queso es atractivo por su sabor y es elaborado con leche bronca y tiende a durar meses en refrigeración mientras que algunas imitaciones o quesos industrializados a pesar de los cuidados tienden a deteriorarse mas facil, en especial por el desarrollo de hongos. Pensamos que ademas del sabor exquisito las comunidades microbianas de este queso influyen en el control de hongos, por lo que hemos decidido conocer la parte cultivable de estas comunidades microbianas y su efecto en el control de hongos, para asi hacer una selección de microorganismos con características antimicrobianas e identificar cuales son los compuestos involucrados en dicha actividad. En un primer intento, se cuantifico la cantidad de UFC/gramo de queso en tres medios de cultivo (MRS, EMB y TSA) y esta fue equivalente a 30x105,15x105 y 58x105UFC/gr. Además, hemos identificado 7 tipos de bacterias Bacillus cereus, Serratia marcecens, Bacillus infantis, Alcaligenes faecalis, Providencia rettgeri, Pseudomonas auriginosa, Myroides adoratimus y 3 levaduras pertenecientes a los géneros Debaromyces, Pichia, Candida, las cuales podemos considerarlas como mayoritarias de acuerdo al tipo de medio utilizado en su aislamiento.

Palabras clave: Antimicrobiano, Queso Chiapas, Debaromyces, Lactobacillus.

REFERENCIAS

[1] Ramos Izquierdo, B. (30 de JULIO de 2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000200006
[2] F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanal

CICLO GAMETOGÉNICO DE ORGANISMOS TRIPLOIDES DE OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas* CULTIVADOS EN EL ESTERO BACOREHUIS, AHOME, SINALOA.

*Hernández-Sepúlveda, J.A., Góngora-Gómez, A.M., Domínguez-Orozco, A.L., Villanueva-Fonseca, B.P.

Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-SINALOA) / Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101.

*Autor para correspondencia: juanhese@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología.

RESUMEN

Existen factores endógenos y exógenos que afectan el desarrollo gonadal de los ostiones. El objetivo del presente fue evaluar los periodos máximos de madurez gonadal mediante análisis histológico en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas*. Para el análisis histológico, mensualmente se sacrificaron veinte organismos, los cuales fueron fijados con solución Davidson y colocados en frascos hasta su deshidratación, clarificación, inclusión, cortes y tinción con hematoxilina y eosina. Por último las muestras fueron analizadas con un microscopio determinando el nivel de madurez gonádica con respecto a cada mes. Se presentaron las siguientes etapas: gónada inactiva, actividad temprana, gónada en desarrollo, madurez y desove. Se identificó un periodo reproductivo con un periodo de desove, donde los organismos iniciaron su reproducción de Octubre 2013 a Julio 2014, con desoves parciales durante Abril y Mayo del 2014 y totales sincrónicos en Junio y Julio del 2014. Se observó que la evolución gonádica está relacionada con los parámetros fisicoquímicos; ya que se determinó que la temperatura es factor fundamental en el desarrollo gonádico y en el desove. Se concluye que aunque se observó un desarrollo gametogénico, estos gametos no son viables, es decir los gametos no logran fijarse y desarrollarse de manera normal.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*; Histología; Gametogénesis; Acuacultura.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, México ocupa el cuarto lugar en producción de moluscos bivalvos en América Latina, después de Chile, Brasil y Perú, siendo los ostiones *Crassostrea virginica*, *C. sikamea*, *C. corteziensis* y *C. gigas*, las especies que más se cultivan. La producción de *C. gigas* por técnicas de cultivo se considera como una de las aportaciones acuícolas más importantes en el mundo, y desde 2003 ha presentado la mayor expansión productiva, aún comparado con la de cualquier otra especie de pez, crustáceo o molusco [1].

El ostión Japonés se introdujo en el Pacífico Mexicano en los inicios de 1970 estableciéndose exitosamente su cultivo comercial. En los años 80´s el ostricultivo intensivo se desarrolló en los estados de Sonora y Sinaloa, Golfo de California, y en la costa Pacífico de los estados de Baja California y Baja California Sur [2]. Sin embargo, en 1997 se presentó una mortalidad de juveniles y adultos en Sonora durante los meses cálidos, reduciendo su producción hasta en 41% [3].

Existe poca información sobre las tasas de mortalidad de *C. gigas* en las áreas de producción en México; no obstante se ha informado de una mortalidad de 40–60% durante el ciclo de cultivo. Los datos disponibles para los métodos experimentales de cultivo muestran una mortalidad acumulada de 15–52% [2]. En otros países, mortalidades masivas de *C gigas* durante los meses cálidos se ha observado ampliamente. Los primeros reportes de mortalidad de ostiones a nivel mundial datan de los años 40´s en Japón. [4] describió esta mortandad como un

resultado de trastornos fisiológicos originados por la formación de gónadas maduras y desoves masivos a causa de las altas temperaturas del agua y la eutrofización de la misma. A finales de los 50´s se presentó mortalidad de *C. gigas* en la costa oeste de Estados Unidos, y fue asociada a maduración y pérdida de reservas de carbohidratos [5].

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Sistema Lagunar Agiabampo-Bacorehuis-Río Fuerte Antiguo. El sistema lagunar Agiabampo – Bacorehuis – Río Fuerte Antiguo, se encuentra ubicado en la zona costera al norte del estado de Sinaloa, México (26°06'- 26°32'N, y 109°01' - 109°20'W), y presenta comunicación directa con el Golfo de California por medio de una boca [6]. Su superficie es de 90,804.45 ha y comprende cinco cuerpos de agua: la laguna de Agiabampo–Bacorehuis, la más grande con 20,891 ha; el estero Las Lajas (314.6 ha); el estero La Chicura Viva (267.5 ha); el estero de San Juan (303.3 ha); y el estero del río Fuerte Antiguo, con una superficie de 1036.1 ha, sumando un total de 22,812.5 ha de espejo de agua permanente.

La laguna de Agiabampo se compone de tres cuerpos de agua principales conectados entre sí, que comparten una sola boca conectada al golfo de California: la bahía de Agiabampo dirigida hacia el norte que culmina con el estero de Bamocha, la bahía de El Jitzámuri orientada al suroeste, y la bahía de Bacorehuis orientada hacia el sureste culminando en el estero de Capoa. Estos cuerpos de agua no presentan aportes de agua dulce naturales importantes, excepto los que recibe de los drenes del Distrito de riego del valle del Carrizo, Fuerte-Mayo y del valle del Fuerte. La profundidad promedio de la laguna de Agiabampo-Bacorehuis es de 2.11 m, con variaciones entre los 9.0 y 0.40 m. En los otros esteros, la profundidad media es como sigue: Las Lajas = 3.0 m, La Chicura Viva = 2.10 m, San Juan = 3.0 m, y Río Fuerte Antiguo = 2.7 m. La temperatura media del agua es de 25.1°C, con oscilaciones desde 13.4 hasta 31.8 °C; y salinidad media de 35.2 ‰ con variaciones desde 18.8 hasta 51.2 ‰. Las riberas de la laguna y los esteros se encuentran circundados con la presencia de mangle rojo (Rhizophora mangle), mangle negro (Avicennia germinans), mangle blanco (Laguncularia racemosa) y botoncillo (Conocarpus erectus) [7]. El clima de la región es del tipo BW(h´)w(e), que se caracteriza por ser cálido muy seco, con una temperatura media anual de 22ºC, y una precipitación media anual de 300 mm [8]. Las actividades económicas que se practican en el área de influencia del sistema lagunar Agiabampo–Bacorehuis–Río Fuerte Antiguo son: La agricultura, pesca, acuacultura, y turismo. Ecológicamente, el sitio se encuentra ubicado en el corredor migratorio de diversas aves proporcionando protección y alimento en su paso, además es zona de refugio, alimentación, protección y crecimiento de especies marinas como crustáceos, peces, moluscos y mamíferos marinos.

Obtención y siembra de la semilla

Para la realización del cultivo se utilizaron 7,000 ostrillas triploides del ostión *C. gigas*, previamente certificadas del laboratorio de CIBNOR-La Paz. El tiempo de duración del cultivo fue de Julio 2013 a Julio 2014. La siembra consistió primeramente en aclimatar la semilla a las condiciones propias de temperatura y salinidad del agua presentes en cada uno de los sitios de cultivo [2]. Una vez aclimatadas, se formó una línea de aproximadamente ½ metro y se dividió el total en partes iguales, después, fueron colocadas dentro de bastidores para evitar pérdidas y depredadores. Después del primer mes de cultivo, la población de cada bolsa se desdobló por talla seleccionando la semilla que rebasaba los 30 mm de longitud, para después, transferirlas a costales ostrícolas a una densidad de 200 organismos por costal. Las ostrillas de menor tamaño fueron regresadas a las bolsas mosquitero. Después de dos meses, todas las semillas fueron colocadas dentro de los costales ostrícolas. Durante todo el ciclo de engorde, los costales ostrícolas fueron limpiados mensualmente con la ayuda de cepillos y espátulas, para evitar el lodo y la presencia de algunos organismos que pudieran afectar a los ostiones.

Parámetros fisicoquímicos

Mensualmente, se midieron los parámetros: temperatura ambiental (termómetro Brannan 76 mm inmersión de –20 a 100º), temperatura del agua y oxígeno disuelto (oxímetro, YSI, 55/12 FT, Ohio 45387), salinidad (refractómetro de precisión, Atago, S/Mill), pH (potenciómetro, Hanna, HI 8314) y profundidad y transparencia con la ayuda del disco de Sechhi.

Análisis histológico

Se llevó a cabo mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina [9]. Cada mes se colectaron 30 organismos; una vez en el laboratorio, se llevaron a cabo las biometrías correspondientes. Antes de sacrificar a los organismos, fueron revisados en su exterior y se verificó el estado gonadal en que se encontraban. Para la fijación de los ostiones, se les inyectó solución Davidson en todo el cuerpo. Una vez fijados, se depositaron en frascos de 1 L donde se mantuvieron por periodos de 24 h hasta 72 h [10]. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de fijador y se les adicionó alcohol al 70%, donde permanecieron hasta el proceso de su análisis histológico [9]. Las muestras conservadas en alcohol al 70% fueron seccionadas de manera longitudinal y ventral para obtener parte de tejido de manto, gónada y branquia principalmente; los cuales fueron colocados en uni-cassettes (VWR CS 1500 TEK WHT 14221-384), a los cuales se les asignó una clave para su identificación. Seguido de esto, los cassettes fueron acomodados en una canastilla de transporte y depositados en el deshidratador de tejidos. Las inmersiones de los tejidos se realizaron incrementando el grado de alcohol en los vasos, iniciando con alcohol etílico al 70, 80, 96 y 100% respectivamente; después, los tejidos se sumergieron en xilol para finalmente, ser embebidos en parafina líquida con el fin de lograr la infiltración de ésta a nivel celular. Se utilizaron dos vasos por reactivo para una mejor deshidratación. Después de la deshidratación, los diferentes tejidos se colocaron en un molde de metal y fueron embebidos con parafina líquida a 64°C con un histoembebedor Jung (Leicainstruments GMBH), posteriormente, los uni-cassettes fueron colocados sobre el molde y una cama de hielo hasta enfriarse y solidificarse en bloques. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótomo Jung Histocut manual (Leica 820). De cada bloque se seleccionaron los cortes más completos y se depositaron en un baño de flotación (Technicare, 092194), para que al extenderse pudieran ser montadas en un portaobjetos, los cuales se colocaron en un horno de incubación con el fin de secarlos, y posteriormente, teñirlos. Las secciones montadas en los portaobjetos fueron teñidas con la tinción de rutina (hematoxilina-eosina-floxina) [11]. La tinción se realizó siguiendo el orden de los reactivos y tiempos de inmersión descritos en la tabla 1. Finalmente, se adicionó resina a las láminas se les colocó el cubreobjetos para su conservación permanente.

Tabla 1. Orden de los reactivos y tiempos de inmersión para la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina-Floxina.

REACTIVOS	TIEMPOS
Xilo	10 minutos
Xilol	10 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol etílico 95%	5 minutos
Agua destilada	10 minutos
Hematoxilina	10 minutos
Agua corriente	5 minutos y 5 sumergidas
Alcohol ácido	2 sumergidas
Agua corriente	3 minutos y 5 sumergidas
Eosina-floxina	3 minutos
Alcohol etílico 95%	3 minutos
Alcohol absoluto	3 minutos
Alcohol absoluto	3 minutos
Xilol	3 minutos
Xilol	3 minutos

Las muestras procesadas fueron analizadas cualitativamente utilizando un microscopio. Las muestras procesadas fueron analizadas cualitativamente utilizando un microscopio Olympus (cx-31), con objetivos de 10x y 40x para determinar las diferentes etapas de maduración de los organismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a las variables ambientales evaluadas, todas se encontraron dentro de los rangos óptimos para el óptimo desarrollo y crecimiento del ostión excepto la temperatura (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios mensuales de las variables ambientales en el cultivo de ostión japonés en el estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa.

	T°AGUA	SALINIDAD	OXIGENO	pH	PROFUNDIDAD	TRANSPARENCIA
jul-13	32.1	40.5	4.15	8.365	0.9	0.9
ago-13	29.65	39	3.05	8.19	0.8	0.8
sep-13	29.05	39.5	2.985	7.895	1.2	1.2
oct-13	25.75	37.5	3.595	8.13	0.3	0.3
nov-13	23.2	36	4.14	7.75	1.2	1.2
dic-13	19.05	31.5	4.555	8.15	0.5	0.5
ene-14	21.95	34	7.705	7.69	1	1
feb-14	23.55	35	6.405	6.52	2	0.5
mar-14	25	30	7.565	8.17	0.6	0.6
abr-14	26	30	5.21	8.155	0.7	0.7
may-14	29.6	34	4.635	7.99	0.5	0.5
jun-14	30.6	37	4.34	8.3	1.2	1.2
jul-14	30.3	35	5.175	8.6	0.9	0.9

Descripción histológica de las fases de desarrollo gonádico

El desarrollo gonádico de los ostiones cultivados se analizó en base a los criterios propuestos por Mann (1979) [12]. Dicha escala comprende 6 estados, los cuales se observaron en el presente estudio:

Estado 0: Gónada inactiva o reposo. La principal característica de esta etapa es la ausencia total de células sexuales así como folículos vacíos, quedando en algunos casos sólo restos de tejido gonádico indiferenciado (tgi) invadido por fagocitos. El espacio ocupado por tejido gonádico es casi totalmente remplazado por tejido conectivo (TC) hasta comenzar de nuevo la etapa gametogénica.

Estado 1: Actividad temprana. Se presenta actividad gametogénica en el tejido conectivo (TC) que cubre la cavidad visceral. El tejido gonádico aparece en forma de islotes con células germinales de diferentes tamaños que evolucionan como óvulos (OV) o espermatozoides (SPZ).

Estado 2: Gónada en desarrollo. Definida por la una gran actividad gametogénica, determinada por la formación de abundantes células sexuales dispuestas en el lúmen del folículo (F).

Estado 3: Madurez. El tejido gonádico ha alcanzado su máximo desarrollo; la gónada (G) se observa como una masa compacta uniforme, con folículos (F) totalmente distendidos desplazando completamente al tejido conectivo. En las hembras, una vez que los óvulos están completamente maduros, se tornan de forma esférica y la pared germinal del folículo adquiere una apariencia de forma irregular y muy delgada característica de esta etapa. En los machos, los folículos aparecen muy aglomerados y sus prácticamente se pueden confundir. En el lúmen del folículo se observan las masas de espermatozoides (SPZ).

Estado 4: Desove. Caracterizado por la expulsión de óvulos y espermatozoides; se aprecia una disminución en la cantidad de gametos y aparición de espacios vacíos (EV) en la gónada. Una vez que los folículos están casi

completamente desovados, comienzan a sufrir invasión fagocitaria; de manera simultánea al desove y conforme avanza se va formando de nuevo el tejido conectivo iniciando alrededor del tracto digestivo.

Estado 5: Reabsorción o post-desove. Se caracteriza por la presencia de grandes espacios vacíos con restos de gametos sexuales: óvulos y espermatozoides de apariencia variable. Los folículos se aprecian muy rotos (fr), se observa una gran actividad de fagocitos destruyendo los restos de las paredes de éstos. También se observa una degeneración de tejido gonádico o reabsorción del mismo, se puede apreciar tejido conectivo invadiendo todo el espacio vacío que ha dejado la gónada (Figura 1 y 2).

Ciclo reproductivo de hembras de ostión japonés Crassostrea gigas triploides:

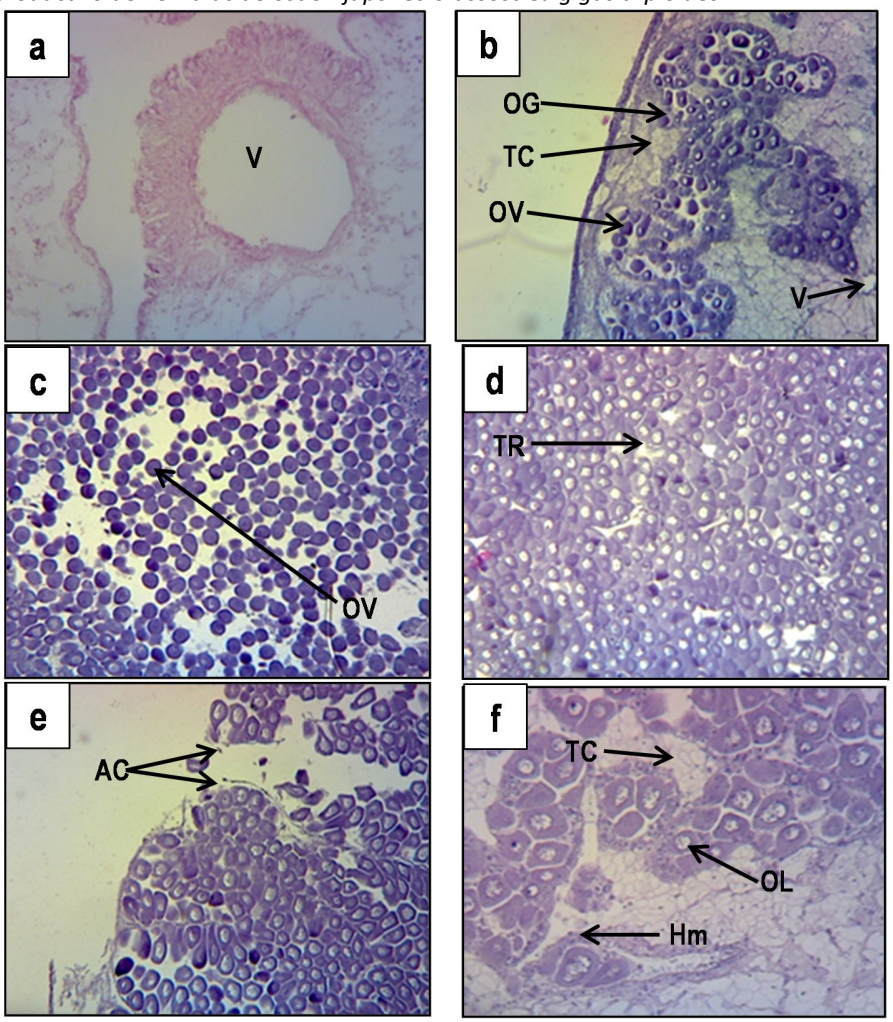


Figura 1. a) Gónada inactiva o reposo: solo se aprecia el tejido conectivo (TC) y vasos hemolinfáticos (V). **b) Actividad temprana:** se observan ovogonias (OG) y algunos ovocitos (OV) así como tejido conectivo (TC) y vasos hemolinfáticos (V). **c) Gónada en desarrollo:** casi no se observa tejido conectivo (TC) abundantes ovocitos (OV) empiezan aparecer óvulos (OVL) con núcleo y nucléolo bien definidos. **d) Madurez:** no hay espacio entre las trabéculas (TR), hay muchos óvulos libres y bien definidos. **e) Desove:** se rompe el acino (AC) y se liberan los óvulos. **f) Reabsorción:** Se observan hemocitos (Hm) atacando los folículos que comienzan a degenerar. Proliferación de tejido conjuntivo.

Ciclo reproductivo de machos de ostión japonés Crassostrea gigas triploides:

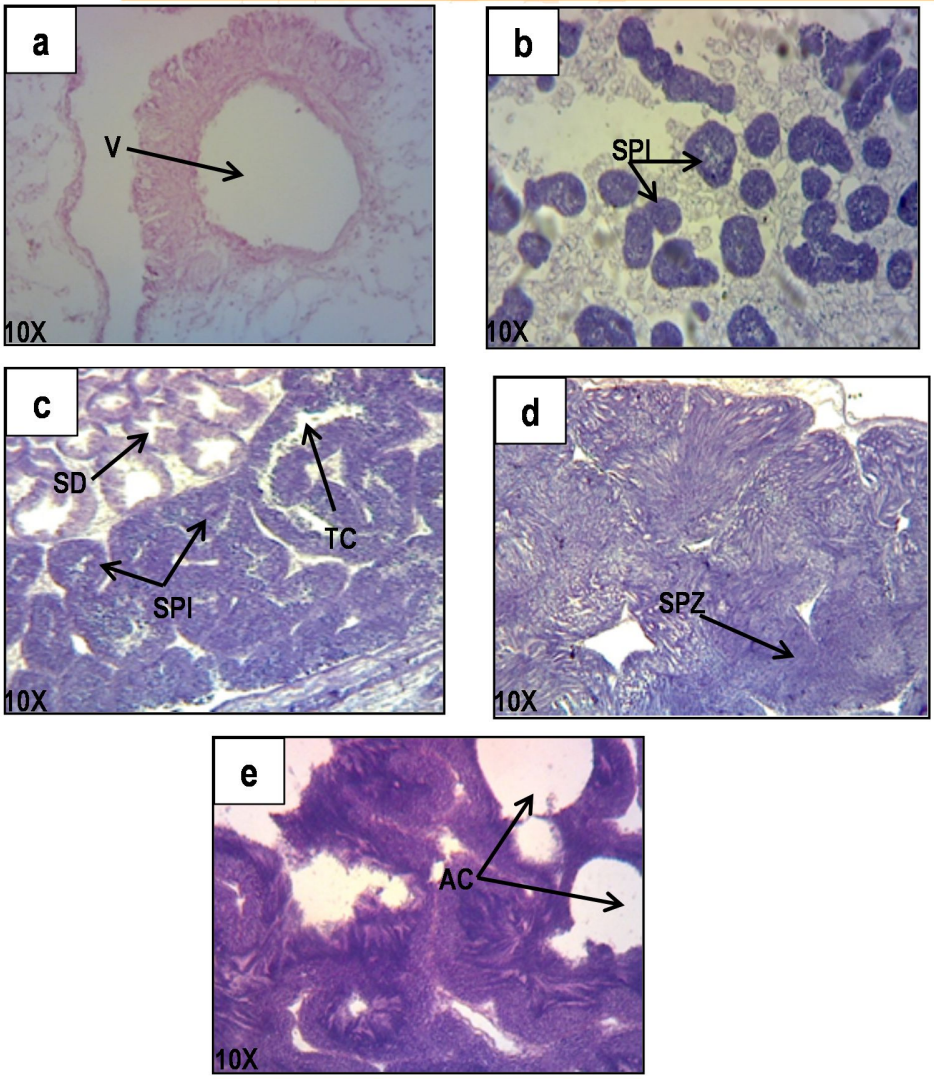


Figura 2. a) Gónada inactiva o reposo: se observa tejido conjuntivo (TC) y vasos hemolinfáticos (V). **b) Actividad temprana:** se observa folículo gonadal (F) y espermatocitos (SPI). **c): Gónada en desarrollo:** se observa el sistema digestivo (SD) con poco tejido conjuntivo (TC) y abundantes espermatocitos (SPI). **d) Madurez:** no hay espacio entre las trabéculas y no se mira el tejido conjuntivo (TC), está lleno de espermatozoides (SPZ) con las colas hacia el centro y las cabezas apuntando hacia el folículo para ser liberados. **e) Desove:** se rompe el acino (AC) y se liberan los espermatozoides.

Frecuencia y proporción sexual de ostión japonés Crassostrea gigas triploides:
Respecto al cultivo en Ahome (Figura 3), los ostiones triploides exhibieron dos desoves parciales en los meses de junio y julio 2014.

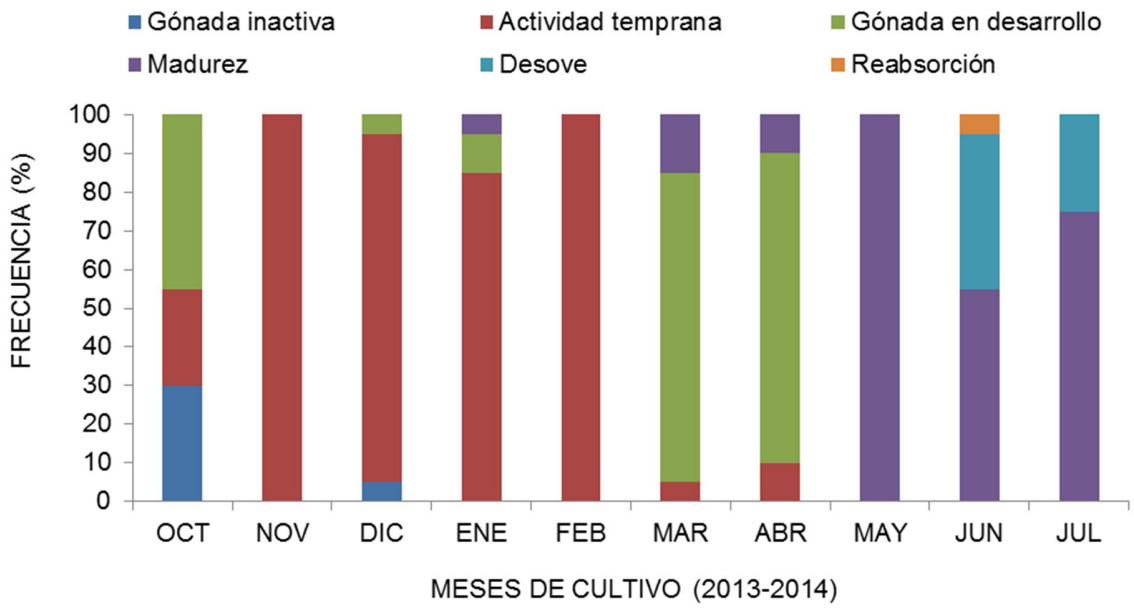


Figura 3. Ciclo reproductivo mensual del ostión japonés *C. gigas* triploide.

Se analizaron un total de 200 especímenes triploides de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Ahome, observando una mayor predominancia de machos durante todo el ciclo de cultivo (Figura 4).

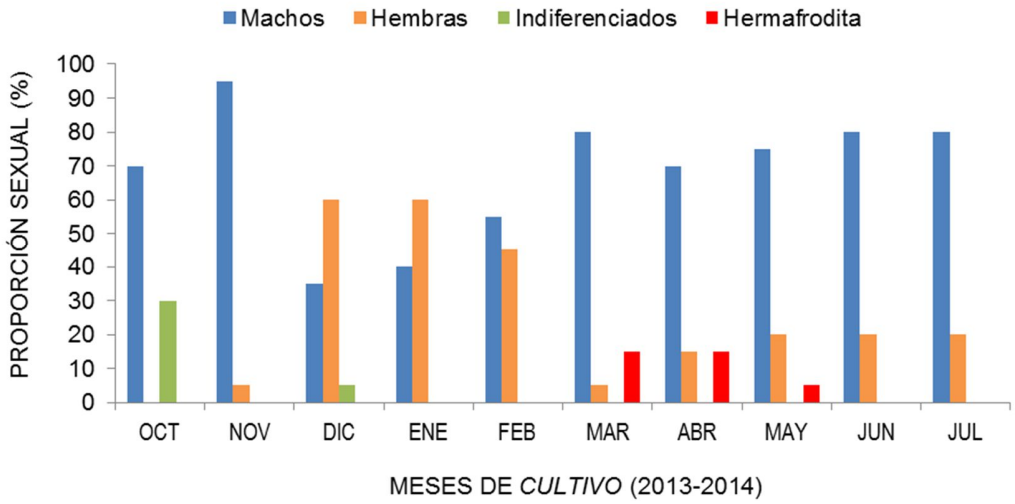


Figura 4. Proporción sexual mensual de organismos triploides.

La explotación y manejo adecuado de cualquier especie requiere del conocimiento preciso de su ciclo reproductivo para inferir periodos de desove, tasas de producción de huevos, tasas de reposición poblacional. Para lograr lo anterior, en el presente estudio se analizó el desarrollo gonádico e identificación de sus estadios, aunque estos pueden ser subjetivos, ya que depende en gran medida de la experiencia del observador [13]. Estos mismos autores, resaltan la necesidad de la histología como una herramienta necesaria para describir los eventos reproductivos relacionados con el desarrollo gametogénico. La interacción de varios factores como la

concentración del alimento, temperatura y el fotoperiodo dirigen el reloj interno reproductivo del ostión japonés *C. gigas*, el cual regula la proliferación gonádica y la maduración de los gametos. Sin embargo, es el alimento el factor que determina la intensidad de la gametogénesis; así, los ostiones que se desarrollan en diferentes ambientes pueden presentar diferentes estrategias reproductivas, desoves completos y sincronizados o desoves parciales no sincronizados [14]. Conocer las características sexuales y los estímulos ambientales que rigen la madurez gonádica y la liberación de gametos es importante ya que sostiene la explotación comercial de moluscos [15] y evidencian las épocas de desove de los ostiones [16].

Crassostrea gigas muestra un ciclo reproductivo estacional relacionado con la temperatura, de manera que el inicio de la gametogénesis se produciría en invierno cuando la temperatura del agua es baja, seguido de una fase de gametogénesis intensa en primavera, maduración y puesta en verano y un período de reabsorción en otoño [17], resultados que difieren del presente estudio, ya que se lograron observar organismos completamente maduros en mayo y dos desoves parciales en los meses de junio y julio 2014. Los ostiones del género *Crassostrea* son hermafroditas secuenciales sin dimorfismo sexual, ya que pueden presentar uno u otro sexo y esta alternancia ocurre de acuerdo con la edad y las condiciones ambientales vigentes [18]. En el caso del hermafroditismo presente durante el desarrollo del presente estudio, es importante recalcar que no es común la aparición de organismos con éstas características y que no se ha establecido una causa común de su origen; sin embargo, algunos autores concluye que la presencia de hermafroditismo es el resultado combinado de factores genéticos y ambientales [19].

La diferencia entre el número de machos y hembras, puede estar relacionada a la estrategia reproductiva del género *Crassostrea* ya que las condiciones ambientales determinan la madurez de las gónadas y el proceso de desove, así como el tiempo de recuperación de las gónadas que exige un gasto energético mayor en las hembras que en los machos, ya que la oogénesis depende de una considerable reserva orgánica [20]. Con la recuperación más rápida de las gónadas, los machos pueden liberar gametos con mayor frecuencia y en cantidad que las hembras. Si la mayoría de los individuos invierten energía para la oogénesis, aumenta las oportunidades de fecundación de los gametos y consecuentemente de éxito reproductivo de la especie.

CONCLUSIONES

- Es la temperatura el parámetro que más influye y determina la madurez gonadal y desoves.
- Se pudo observar un desarrollo gametogénico, sin embargo los gametos no logran fijarse en un sustrato y desarrollarse de manera normal.
- Se identificó un periodo reproductivo con dos periodos de madurez, uno en los meses de marzo y abril 2014 con un 20 y 15 %, y el mes de mayo con un 100%.
- En cuanto a la proporción sexual de organismos triploides, predominaron los machos sobre las hembras (1:0.51).

REFERENCIAS

[1] FAO, "Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*". Programa de información de especies acuáticas. Texto de Helm, M. M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 13 April 2005. [Citado 24 February 2014]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es#tcNA00EA, 2005-2014.

[2] M. C. Gallo-García; M. García-Ulloa; D. E. Godínez and K. Rivera, "Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1875) en Barra de Navidad, Jalisco, México". Universidad y Ciencia 17(34): 83-91, 2001.

[3] J. Chávez-Villalba; R. Villelas-Ávila and C. Cáceres-Martínez. "Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México". Aquaculture Research 38: 268-278, 2007.

[4] A. Koganezawa, "Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention". Proceedings of the Third U.S.–Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan. 29–34, 1975.

[5] D. P. Cheney; B. F. MacDonald and R. Elston, "Summer mortality of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget sound, Washington, 1998" Journal of Shellfish Research. 19 (1): 353-359, 2000.

[6] INEGI, "II Conteo de población y vivienda 2005". http://www.inegi.gob.mx, 2005.

[7] E.Romero Beltrán; H. J. Parra Osuna; J. L. Guevara Osuna;, J. A. Bect Valdéz and S. Retamoza Leyva, "Variación estaciónal de la calidad del agua en el sistema lagunar Agiabampo– Bacorehuis. México". Informe de investigación. I.N.P. CRIP Mazatlán. Mazatlán, Sinaloa México. 17 p, 2002.

[8] Secretaría de Marina, "Estudio de la Calidad del Agua en el estero El Capoa. Ramificación de la bahía de Bacorehuis, del sistema lagunar de Agiabampo". Informe técnico. Estación de Investigación Oceanográfica del Pacifico Centro. Topolobampo, Sinaloa. 13 p, 1999.

[9] J. Chávez-Villalba; A. Ibarra-Hernández; M. López-Tapia and J. Mazón-Suástegui, "Prospective Culture of the Cortez Oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: Growth, Gametogenic Activity, and Condition Index". Journal of Shellfish Research 27(4):711-720, 2008.

[10] G. L. Humason, "Animal tissue techniques". W. H. Freeman and Cia. San Francisco, USA, 572, 1972.

[11] D. V. Lightner, "A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp". World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 304, 1996.

[12] R. Mann, "Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures". Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 59. 95-110, 1979.

[13] B. J. Barber and N. J. Blake, "Reproductive Physiology". En: Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science vol. 21. Shumway, S.E. (ed.). Elsevier. Amsterdam. 1777-191, 1991.

[14] M. Enríquez-Díaz; S. Pouvreau; J. Chávez-Villalba and M. Le Pennec, "Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy". Aquaculture International 17(5): 491-506. 2009.

[15] M. Cledón; A. C. P. Brichtova J. L. Gutiérrez and P. E. Penhaszadeh, "Reproductive cycle of the stout razor clam, *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786), in the Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina". *Journal of Shellfish Research*, vol. 23, no. 2, 443-446, 2004.

[16] M. S. N. Galvão; O. M. Pereira; I. C. Machado and M. B. Henriques, "Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliana* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25ºS, 48ºW)". Boletim do Instituto de Pesca 26(2): 147-162.Gascoigne, J.C., Beadman, H.A., Saurell, C., Kais, 2000.

[17] C. Fabioux; A. Huvet; P. Le Souchu; M. Le Pennec and S. Pouvreau, "Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* internal clock". Aquaculture 250: 458-470, 2005.

[18] T. M. Lenz and G. Boehs, "Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidade) en la Bahía de Camamu, Bahía, Brasil". *Revista de Biología Tropical* , vol. 59, 137-149, 2011.

[19] A. García-Cubas, "Publicaciones Especiales Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, en prensa. Moluscos de un sistema lagunar Tropical al sur del Golfo de México", 1980.

[20] P. S. Galtsoff, "The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin". U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Ser. Fish. Bull., 64-480, 1964.

OXIDATIVE STRESS AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN GREEN TURTLE (*Chelonia mydas*) AFLICTED WITH FIBROPAPILLOMA IN MEXICAN CARIBBEAN.

[1]*Labrada-Martagón, V., [2]Muñoz-Tenería, F.A. y [3]Zenteno-Savín, T.

1. Facultad de Ciencias, UASLP, Av. Salvador Nava Martínez s/n Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P, México, CP 78290, Tel. +52(444)826-2316, vanessa.labrada@uaslp.mx
2. Facultad de Agronomía y Veterinaria, UASLP, Km. 14.5 Carretera Matehuala, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, S.L.P., México, CP 78321, +52(444) 852- 4056, fernando.munoz@uaslp.mx
3. Programa de Planeación Ambiental y Conservación, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), S.C., Instituto Politécnico Nacional #195, Playa Palo Santa Rita Sur, La Paz, Baja California Sur, México, CP 23096, +52(612) 123-8502, tzenteno04@cibnor.mx

*Autor para correspondencia: vlabrada@gmail.com

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

Fibropapillomatosis (FP) is a worldwide epizootic threat for the survival of sea turtles, documented worldwide in green turtle (*Chelonia mydas*) populations. The etiology and pathogenesis of FP remains unknown; it is a multifactorial neoplastic chronic disease frequently associated to herpesvirus. The increased prevalence of FP in the last years in the coast of Mexican Caribbean may be an indicator of the altered habitat conditions. Cumulative production of reactive oxygen species (ROS) through endogenous (e.g. activated immune system) or exogenous factors (e.g. xenobiotics) are involved in the pathophysiology of several diseases and carcinogenesis. The goal of this study was to evaluate differences in the oxidative stress indicators between healthy green turtles and those afflicted with FP and their relationship with hematological parameters. Immature green turtles inhabiting foraging grounds were captured alive in the coast of Quintana Roo, Mexico. Differential, total white blood cell counts and frequency of nuclear abnormalities in erythrocytes were determined. Superoxide radical production (O2•-), activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GST, GPx, GR) and indicators of oxidative damage (TBARS and carbonyl proteins) were determined in intraerythrocytic material. During summer 2015, 11 green turtles were captured in Punta Herrero (control group) inside of the Natural Reserve of Sian Ka'an; 22 individuals were captured in the touristic bay of Akumal. Prevalence of FP in Akumal was 22.7% (n=5) while FP was not observed in sea turtles from Punta Herrero. Nuclear abnormalities determined in Akumal were 94% times higher than in Punta Herrero. Statistical differences were not found for indicators of oxidative stress when healthy individuals were compared between zones, neither between green turtles from Akumal with and without FP. In Akumal, the median of the CAT activity and concentration of TBARS concentration was higher (percentage change 87% and 44%, respectively) in both healthy turtles and those with FP compared to the control group, while lower activity of SOD, GST and GPx (percentage change -16%, -9% and -43% respectively) was found in turtles afflicted with FP. Antioxidant defenses and levels of O2•- presented significant correlations with monocyte, basophil and heterophil counts (cells µL-1) as expected. Results suggest that sea turtles from Akumal showed adaptive biochemical and immune responses not observed in Punta Herrero, probably to cope with their

particular habitat conditions. Increase of sample size including new study sites is required in order to continue monitoring the health state of this population.

Keywords: fibropapillomatosis; oxidative stress; health; sea turtles.

INTRODUCCIÓN

Las principales amenazas para la conservación de las tortugas marinas son la pesca incidental, la captura ilegal para uso y consumo humano, el desarrollo urbano costero, deterioro de las playas de anidación, contaminación, prevalencia de enfermedades y el cambio climático [1]. Las tortugas marinas son consideradas especies centinelas del estado de salud del hábitat marino-costero en que habitan y de degradación ambiental [2]. Permiten caracterizar el hábitat local y perturbaciones ambientales bajo un contexto eco-toxicológico, incluso en áreas prístinas sin desarrollo industrial, a través de la evaluación de sus respuesta clínicas (*e.g.* niveles de enzimas transaminasas, proteínas séricas), bioquímicas (*e.g.* activación de las defensas antioxidantes) y fisiológicas (*e.g.* competencia por sitios de unión con esteroides sexuales) asociadas a la exposición a contaminantes químicos como plaguicidas y metales pesados, eutrofización, dinámica de los recursos (estacionalidad), e incidencia de enfermedades [2]–[8].

La fibropapilomatosis (FP) es una enfermedad emergente que amenaza la supeviviencia de a largo plazo de las poblaciones de tortuga blanca (*Chelonia mydas*) alrededor de todo el mundo. A pesar de décadas de estudio, existen grandes vacíos en el conocimiento de la patogenia y epizootiología de la enfermedad y muy pocos estudios le han dado un seguimiento a largo plazo [9]. Es una enfermedad neoplásica crónica, de etiología múltifactorial, frecuentemente asociada a herpesvirus [10]. El FP se caracteriza por presentar tumores fibroepiteliales en diferentes tejidos blandos, pero también han sido descritos en caparazón y plastron, así como internamente durante necropsias en etapas tardías de la enfermedad. Mixiofibromas, papilomas, fibromas y fibropapilomas son los tipos de tumores asociados a la enfermedad en sus diferentes fases (aguda y crónica) [11]. En la costa de Quintana Roo existe evidencia de un incremento en la incidencia de FP en donde la clase de edad más afectada es la de los juveniles [12]. La prevalencia de FP en la pobación de tortuga blanca que habita en Quintana Roo puede ser utilizado como un indicador de perturbación ambiental. La degradación ambiental, cambio de uso de suelo y la contaminación, todos relacionados al desarrollo antropogénico, se han sugerido como factores ambientales que pueden predisponer el desarrollo de neoplasias e incidencia del FP en las poblaciones en vida libre de tortugas marinas, provocando estados de inmunodepresión y alteraciones clínicas en los individuos [4], [11], [13]. Factores intrínsecos a los organismos (*e.g.* condición corporal) ó al ambiente (*e.g.* presencia de toxinas, cambio del uso de suelo) pueden modificar las respuestas de defensa [14] e incrementar la susceptibilidad a enfermedades en fauna silvestre [15]. Por lo anterior, se vuelve prioridad identificar biomarcadores sensibles de los efectos negativos a la salud de los organismos, previo a observar los efectos negativos en las poblaciones, como una disminución en la tasa de supervivencia [16].

Los radicales libres, como las especies reactivas de oxigeno (ERO) son moléculas producto del metabolismo celular normal (*e.g.* respiración celular), con funciones de señalización que regulan variedad de procesos biológicos y fisiológicos. Participan en procesos inflamatorios, destruyen patógenos, reparan tejidos, participan en el metabolismo de xenobióticos, inducen la senescencia celular y apoptosis y, por ende, tienen función antitumoral [17]–[19]. El desbalance entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes genera una desregulación de la homeostasis celular conocida como

estrés oxidativo [20]. La producción acumulada de ERO, ya sea a través de factores endógenos (*e.g.* respuesta inflamatoria) o exógenos (*e.g.* desórdenes inflamatorios, infecciones crónicas, xenobióticos), se asocia a la patofisiología de múltiples enfermedades y carcinogénesis [17]. Las ERO al ser moléculas altamente reactivas pueden interactúan con sustratos como proteínas, carbohidratos y lípidos, generando daño a la estructura y función celular [19] e incluso, pueden ocasionar mutaciones inducidas por el daño oxidativo al ADN y modificar la expresión génica, todo esto de gran relevancia en el estudio de la carcinogénesis y proliferación celular [17], [21]. La evaluación de los indicadores de estrés oxidativo en la especie *Ch. mydas* han resultado ser excelentes biomarcadores de diferencias regionales y locales en las características del hábitat y en la exposición crónica a contaminantes (zona agrícola vs. procesos oceánicos naturales), a través de las respuestas diferenciales en los grupos de estudio en la actividad de las defensas antioxidantes enzimáticas y niveles de estrés oxidativo [2].

Entre las prioridades de investigación reconocidas para el manejo y conservación de las tortugas marinas se encuentran la determinación del estado de salud de las poblaciones, de los niveles basales de sus parámetros de salud y la evaluación de las alteraciones fisiológicas que los organismos puedan estar presentando en respuesta a la exposición a contaminantes y condiciones locales de degradación ambiental [22]. El objetivo general del estudio fue determinar la actividad de las defensas antioxidantes enzimáticas y los niveles de indicadores de estrés oxidativo en sangre de tortugas blancas (*Ch. mydas*) que habitan en la costa de Quintana Roo. Los objetivos particulares de este estudio fueron evaluar diferencias en los indicadores de estrés oxidativo entre tortugas sanas y enfermas (FP), evaluar diferencias entre zonas con distinto grado de perturbación y evaluar la relación entre los indicadores de estrés oxidativo y los parámetros hematológicos de los individuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de los ejemplares y obtención de las muestras biológicas

El trabajo de captura de ejemplares se llevó a cabo en dos localidades de Quintana Roo: el Refugio Marino Bahía de Akumal (AK, 20°24'0"N, 87°19'16"O) y en la localidad de Punta Herrero (PH), este último considerado en el presente estudio como el grupo control, al estar ubicado dentro de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, (19º27'37.7''N, 87º27'04.2''O). El método de captura depende de las condiciones del hábitat y del tamaño de los organismos [12]; en PH la captura de las tortugas marinas se realizó utilizando la técnica de avistamiento y persecución de ejemplares en bote, para alcanzarlas y proceder a la captura con equipo de snorquel y aletas. La captura de ejemplares en AK se realizó utilizando la técnica de captura en apnea usando equipo de snorquel, con la participación en la captura en el agua de siete nadadores, quienes localizaban a las tortugas alimentándose o descansando en el fondo (profundidad entre 1.5 y 3 m), sumergiéndose y sujetándolas por la parte craneal y caudal del carapacho para emerger con el ejemplar, en espera de que el bote se acercara. Tras haber capturado a los ejemplares estos eran subidos al bote donde se procedía inmediatamente a tomar la muestra sanguínea (7 mL) con la finalidad de no alterar los parámetros. La muestra se tomó del seno venoso cervical siguiendo la forma descrita [23], utilizando agujas 21 G (39 mm) y tubos Vacutainer© con heparina de litio (He/Li) como anticoagulante, manteniéndose en hieleras con refrigerantes hasta volver al campamento en donde fueron procesadas [2]. En PH se colectaron de 2 a 3 mL de sangre por tratarse de tortugas juveniles de tallas pequeñas. Se registró el largo curvo (LCC) y ancho curvo del caparazón (ACC), se realizó una revisión física detallada para detectar la presencia de fibropapilomas. En las tortugas donde fue detectada la presencia de tumores se realizó un registro detallado de los mismos de acuerdo al formato estándar, Protocolo Estandarizado para Fibropapilomatosis, registrando la

ubicación y las medidas de cada tumor. Cada animal fue marcado con placas de acero monel (algunos ejemplares no fueron marcados debido a una talla demasiado pequeña para ello) y se liberaron inmediatamente.

Determinaciones analíticas.

El conteo absoluto de la línea celular blanca y roja se realizó de acuerdo a la metodología descrita [24] diluyendo 1µl de sangre fresca en solución de Natt–Herrick, el conteo simultáneo en fresco de eritrocitos y leucocitos se hizo con ayuda de cámara de Neubauer y microscopio óptico (40x) presntando los resultados en células x 10x μL^{-1} [25], [26]. El conteo diferencial de la serie blanca se realizó en laminillas preparadas con sangre completa por el método de extensión [27] secadas al aire y teñidas utilizando hemocolorante rápido de tres pasos (Marca Hycel, cat 548) [26]. La cuenta leucocitaria diferencial se hizo con un microscopio óptico (100x) contando 100 leucocitos por laminilla, clasificando las células como linfocitos, heterófilos, eosinófilos, monocitos y basófilos [28]. Los datos se presentan como proporciones celulares (%) y la razón heterófilos/linfocitos (H/L) [25], [26]. Se determinó la frecuencia de anormalidades nucleares (micronúcleos y prolongaciones nucleares) en eritrocitos de acuerdo al protocolo desarrollado para tortugas marinas [29].

El resto de la muestra de sangre fue centrifugada por 15 minutos (890×g) para separar el plasma y eliminar la capa de leucocitos. El material intracelular se obtuvo mediante la lisis de las células rojas por medio de choque osmótico y mecánico de acuerdo al método descrito [30]. El plasma y material intracelular fue transferido a microtubos (crioviales 1.5 mL, Eppendorf©) debidamente etiquetados y fueron mantenidos y transportados en un contenedor criogénico hasta llegar al laboratorio de Estrés Oxidativo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.C., en donde fueron almacenadas en congelación a -80° C hasta su procesamiento.

En cada una de las muestras se determinaron como indicadores de estrés oxidativo la producción de radical superóxido ($O_2^{-\bullet}$), concentración de proteínas carboniladas y concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicador de los niveles de peroxidación de lípidos. Como marcadores de la respuesta antioxidante se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-disulfuro reductasa (GR). La actividad de las enzimas antioxidantes e indicadores de estrés oxidativo se cuantificaron en el material intracelular por medio de técnicas espectrofotométricas, siguiendo los protocoles publicados [2], [31]–[33]. Todas las muestras serán analizadas en triplicado. Con la finalidad de estandarizar los resultados se cuantificó la concentración de hemoglobina (Hb) de cada muestra, utilizando kit comerciales Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan) y un analizador bioquímico semiautomatizado Microlab 300 (Dieren, Netherlands) a 540 nm [2]. Todos los resultados de las defensas antioxidantes son expresados en unidades de actividad enzimática por gramo de hemoglobina, U g^{-1} Hb, Los resultados sobre la producción endógena de radical superóxido como nmol $O_2^{-\bullet}$ min^{-1} mg^{-1} Hb, y los niveles de proteínas carboniladas y TBARS se expresan en nmol mg^{-1} Hb.

Análisis estadísticos

Previo a realizar los análisis estadísticos se realizaron análisis exploratorios para detectar datos extremos y se evaluó el supuesto de normalidad en las variables de estrés oxidativo utilizando la prueba de Shapiro-Wilk [34]. Debido a que las variables no presentaron normalidad en los datos ($p<0.001$) los resultados se presentan como mediana, percentiles (25 y 75%) y rango intercuartil. Se utilizaron pruebas

no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskall Wallis para evaluar diferencias entre individuos agrupados por zona de estudio y por estado de salud sin considerar los datos detectados como extremos de acuerdo a la prueba de Grubbs (poner datos extremos) [34], [35]. El nivel de significancia considerado fue de $\alpha \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el verano 2015, se capturaron 11 tortugas blancas en PH (grupo control) dentro de la Reserva de la Biósfera de Sian Ka'an y 22 individuos fueron capturados en la zona turística Refugio Marina de AK. La prevalencia de FP en AK fue de 22.7% (n=5) mientras que la FP no fue detectada en los organismos capturados en PH. Las tortugas afectadas por FP presentaron una respuesta antioxidante de GPx, GST, GR, SOD, (cambio porcentual -43.5%, -42.8%, -37%,-35%, respectivamente) menor en comparación con los valores medios de las tortugas sanas de PH. Existe evidencia de que la prevalencia de FP en AK se ha incrementado en los últimos diez años de estudio, siendo la conjuntiva o párpado en ojos (64%) y las aletas (16%) las regiones anatómicas más afectadas [12]. El FP es una enfermedad emergente que pone en riesgo la supervivencia de *Ch. mydas,* especie catalogada en peligro de extinción [36].

Los niveles de actividad enzimática de las defensas antioxidantes medidos en este estudio presentan valores por encima de los reportados en tortugas de la misma especie que habitan en la costa occidental de la Península de Baja California Sur, hábitat considerado como prístino al no presentar perturbación humana, desarrollo urbano o actividad industrial [2]. Las tortugas de AK presentaron un menor número absoluto de heterófilos (-22%) y monocitos (-100%) y un mayor número absoluto de eosinófilos (50%) al comparar el cambio porcentual de la mediana con el grupo control. Los indicadores de estrés oxidativo presentaron correlaciones significativas con los valores hematológicos (cells μL^{-1}) en ambas zonas, tales como el número de heterófilos, basófilos y monocitos (p<0.04), encontrándose los coeficientes de correlación más bajos en las tortugas blancas de AK. La relación entre el radical superóxido y las enzimas antioxidantes con los parámetros hematológicos era de esperarse dada la función de las mismas durante los procesos inflamatorios [18]. La frecuencia de anormalidades nucleares de las tortugas sanas de AK fue 100 veces mayor que la observada en PH. Los micronúcleos y prolongaciones nucleares son reconocidos como un biomarcador de los efectos de genotoxicidad en humano y fauna silvestre [37]–[39]. La determinación de su frecuencia permite detectar la ocurrencia y biodisponibilidad de compuestos genotóxicos en el ambiente (*e.g.* contaminantes químicos y fármacos), así como la exposición crónica de los organismos a los mismos durante estudios ecotoxicológicos [40]. AK forma parte de un corredor turístico en la costa de Quintana Roo en donde el turismo de masas es el modelo de desarrollo urbano, constituido por infraestructura de hoteles y generación de servicios para turistas donde la tortuga blanca es uno de los principales atractivos turísticos de la bahía [41]. Existe evidencia de introducción continua de agua residual no tratada a la bahía de AK, flujo de contaminación y coliformes fecales [42], [43]. Lo anterior se confirma con los resultados de nuestro estudio. En AK, las tortugas blancas tanto sanas como enfermas presentaron una mayor actividad de la GST, CAT, GR y mayor concentración de proteínas carboniladas (daño oxidativo) que los individuos de PH. Dichas enzimas tienen una función detoxificante; la enzima GST en particular participa en el metabolismo de xenobióticos por lo que puede utilizarse como un biomarcador de las respuestas fisiológicas ante la exposición de contaminantes químicos [20]. Resulta imperativo continuar el monitoreo del estado de salud de la tortuga blanca que habita en AK a través de biomarcadores tempranos de perturbación ambiental.

CONCLUSIONES

En este estudio se obtienen por vez primera datos sobre las respuestas fisiológicas de tortugas marinas sanas y con presencia de FP que habitan en del Caribe Mexicano y sobre la relación entre los indicadores de estrés oxidativo y los parámetros hematológicos de las mismas. La información generada será la base para futuras evaluaciones del estado de salud de la población. Las tortugas blancas de AK presentarón una menor proporcion de células fagocíticas circulantes, menor actividad de SOD y GPx, una mayor actividad de GST, CAT, mayor concentración de proteínas carboniladas, así como de la frecuencia de anormalidades nucleares en eritrocitos, en comparación con las tortugas que habitan en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an. Dichos resultados siguieren una mayor exposición a contaminantes químicos en las tortugas marinas que habitan en Bahía AK. Es probable que los organismos de AK esten presentendo respuestas biquímicas e innumológicas adaptativas a las condiciones particulares de su hábitat, tales como degradación ambiental y desarrollo urbano. Las tortugas afectadas por FP presentaron una menor variabilidad en todos los indicadores de estrés oxidativo con excepción de la actividad de la enzima CAT, en comparación con el grupo control y con individuos sanos de la misma zona. Es necesario incrementar el tamaño de muestra e incluir nuevos sitios de muestreo en la costa de Quintana Roo para obtener inferencias estadísticas más robustas y para continuar monitoreando el estado de salud de esta población.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a R. Herrera-Pavón y A. Negrete-Philippe por su ayuda durante la realizacion del trabajo de campo, captura y manejo de los animales. A O. Lugo-Lugo and N.O. Olguín-Monroy, Laboratorio de Estrés Oxidativo, CIBNOR por su ayuda durante el procesamiento de muestras. El trabajo de captura de ejemplares se llevó a cabo bajo el Permiso de Colecta Científica SGPA/DGVS/09454/15. Este estudio fue financiado por CONANP/SEMARNAT (F00.0.DRPYCM.UTCMR.-0261/2015) y fue parte del proyecto de investigación de VLM realizado con beca Posdoctorado Nacional CONACYT en la Facultad de Agronomía y Veterinaria, UASLP.

REFERENCIAS

[1] B. P. Wallace, A. D. DiMatteo, A. B. Bolten, M. Y. Chaloupka, B. J. Hutchinson, F. A. Abreu-Grobois, J. A. Mortimer, J. A. Seminoff, D. Amorocho, K. A. Bjorndal, J. Bourjea, B. W. Bowen, R. Briseño Dueñas, P. Casale, B. C. Choudhury, A. Costa, P. H. Dutton, A. Fallabrino, E. M. Finkbeiner, A. Girard, M. Girondot, M. Hamann, B. J. Hurley, M. López-Mendilaharsu, M. A. Marcovaldi, J. A. Musick, R. Nel, N. J. Pilcher, S. Troëng, B. Witherington, and R. B. Mast, "Global Conservation Priorities for Marine Turtles," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e24510, Sep. 2011.

[2] V. Labrada-Martagón, P. a. Tenorio Rodríguez, L. C. Méndez-Rodríguez, and T. Zenteno-Savín, "Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (Chelonia mydas) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula," *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 154, no. 2, pp. 65–75, 2011.

[3] A. Talavera-Saenz, S. C. Gardner, R. Riosmena, and B. Acosta-Vargas, "Metal profiles used as environmental markers of green turtle (Chelonia mydas) foraging resources," *Sci. Total Environ.*, vol. 373, pp. 94–102, 2007.

[4] K. S. Van Houtan, S. K. Hargrove, and G. H. Balazs, "Land use, macroalgae and tumor-forming disease in marine turtles," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, pp. 1–9, 2010.

[5] M. P. Ikonomopoulou, H. Olzowy, M. Hodge, and A. J. Bradley, "The effect of organochlorines and heavy metals on sex steroid-binding proteins in vitro in the plasma of nesting green turtles, Chelonia mydas," *J. Comp. Physiol. B*, vol. 179, pp. 653–662, 2009.

[6] V. Labrada-Martagón, L. C. Méndez-Rodríguez, S. C. Gardner, M. López-Castro, and T. Zenteno-Savín, "Health Indices of the Green Turtle (Chelonia mydas) Along the Pacific Coast of Baja California Sur, Mexico. I. Blood Biochemistry Values," *Chelonian Conserv. Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 162–172, 2010.

[7] V. Labrada-Martagón, L. Méndez, M. Mangel, and T. Zenteno-Savín, "Applying generalized linear models as an explanatory tool of sex steroids, thyroid hormones and their relationships with environmental and physiologic factors in immature East Pacific green sea turtles (Chelonia mydas)," *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, vol. 166, pp. 91–100, 2013.

[8] M. Camacho, O. P. Luzardo, L. D. Boada, L. F. López, M. Medina, M. Zumbado, and J. Orós, "Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: Evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles," *Sci. Total Environ.*, vol. 458–460, pp. 283–289, 2013.

[9] K. Jones, E. Ariel, G. Burgess, and M. Read, "A review of fibropapillomatosis in Green turtles (Chelonia mydas)," *Vet. J.*, vol. 212, pp. 48–57, Jun. 2016.

[10] T. M. Work, R. A. Rameyer, G. H. Balazs, C. Cray, and S. P. Chang, "Immune status of free-ranging green turtles with fobropapilomatosis from Hawaii," *J. Wildl. Dis.*, vol. 37, no. 3, pp. 574–581, 2001.

[11] T. M. Work, "Cancer in sea turtles," *Hawaii Med. J.*, vol. 64, pp. 23–24, 2005.

[12] F. A. Muñoz, R. L. Herrera, A. C. Negrete-Philippe, T. M. Work, V. Labrada-Martagón, and M. González, "Evaluación de la presencia de fibropapilomas en las tortugas marinas de Quintana Roo," San Luis Potosí, 2015.

[13] A. A. Aguirre and P. L. Lutz, "Marine turtles as sentinels of ecosystem health: Is fibropapillomatosis an indicator?," *Ecohealth*, vol. 1, pp. 275–283, 2004.

[14] R. M. Martínez-Álvarez, A. E. Morales, and A. Sanz, "Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors," *Rev. Fish Biol. Fish.*, vol. 15, pp. 75–88, 2005.

[15] P. Daskak, A. A. Cunningham, and A. D. Hyatt, "Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health," *Science (80-.).*, vol. 287, pp. 443–449, 2000.

[16] M. Hamann, M. H. Godfrey, J. A. Seminoff, K. Arthur, P. C. R. Barata, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, A. C. Broderick, L. M. Campbell, C. Carreras, and et al., "Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century," *Endanger. Species Res.*, vol. 11, pp. 245–269, 2010.

[17] J. E. Klaunig and L. M. Kamendulis, "THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN CARCINOGENESIS," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 44, no. 1, pp. 239–267, Feb. 2004.

[18] C. Nathan and A. Cunningham-Bussel, "Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 5, pp. 349–361, Apr. 2013.

[19] M. Schieber and N. S. Chandel, "ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 10, pp. R453–R462, May 2014.

[20] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford Univsersity Press, 1999.

[21] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006.

[22] A. Rees, J. Alfaro-Shigueto, P. Barata, K. Bjorndal, A. Bolten, J. Bourjea, A. Broderick, L. Campbell, L. Cardona, C. Carreras, P. Casale, S. Ceriani, P. Dutton, T. Eguchi, A. Formia, M. Fuentes, W. Fuller, M. Girondot, M. Godfrey, M. Hamann, K. Hart, G. Hays, S. Hochscheid, Y. Kaska, M. Jensen, J. Mangel, J. Mortimer, E. Naro-Maciel, C. Ng, W. Nichols, A. Phillott, R. Reina, O. Revuelta, G. Schofield, J. Seminoff, K. Shanker, J. Tomás, J. van de Merwe, K. Van Houtan, H. Vander Zanden, B. Wallace, K. Wedemeyer-Strombel, T. Work, and B. Godley, "Are we working towards global research priorities for management and conservation of sea turtles?," *Endanger. Species Res.*, vol. 31, pp. 337–382, Dec. 2016.

[23] D. W. Owens and G. J. Ruiz, "New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles," *Herpetologica*, vol. 36, no. 1, pp. 17–20, 1980.

[24] M. P. Natt and C. A. Herrick, "A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken," *Poult. Sci.*, vol. 31, no. 4, pp. 735–738, 1952.

[25] F. A. Muñoz, S. Estrada-Parra, A. Romero-Rojas, E. González-Ballesteros, T. M. Work, H. Villaseñor-Gaona, and I. Estrada-García, "Immunological evaluation of captive green sea turtle (Chelonia mydas) with ulcerative dermatitis," *J. Zoo Wildl. Med.*, vol. 44, no. 4, pp. 837–844, 2013.

[26] L. A. Robledo and F. A. Muñoz, "Medición del efecto del extracto dializable de leucocitos (Transferón(R)) en diferentes dosis, en el númeroo de leucocitos de sangre periférica y linfocitos T CD3+ en lesiones de piel en tortugas marinas juveniles (Chelonia mydas) con dermatitis ulcerativ," Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 2011.

[27] M. M. Benjamin, *Manual de patología clínica en veterinaria*. D.F.: Limusa, 1991.

[28] T. M. Work, R. E. Raskin, G. H. Balazs, and S. D. Whittaker, "Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles," *AJVR*, vol. 59, no. 10, pp. 1252–1257, 1998.

[29] V. Labrada-Martagon, F. A. Muñoz, and T. Zenteno-Savin, "Estandarización de la prueba de micronucleos en sangre periférica de tortuga marina: alternativa toxicológica no invasiva.," in *Perspectivas y Avances de la Producción Animal en México*, Primera., H. A. Lee, H. M. Ramírez, and J. S. Roque, Eds. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2016, pp. 554–564.

[30] C. E. Pippenger, R. W. Brown, and D. Armstrong, "Regulatory antioxidant enzymes.," in *Methods in Molecular Biology, Free Radicals and Antioxidants Protocols.*, D. Armstrong, Ed. New Jersey: The Humana Press, 1998, pp. 299–313.

[31] M. Vélez-Alavez, V. Labrada-Martagón, L. C. Méndez-Rodriguez, F. Galván-Magaña, and T. Zenteno-Savín, "Oxidative stress indicators and trace element concentrations in tissues of mako shark (Isurus oxyrinchus)," *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 165, no. 4, pp. 508–514, 2013.

[32] J. P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín, and R. Elsner, "Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 142, no. 3, pp. 198–204, 2006.

[33] R. I. López-Cruz, T. Zenteno-Savín, and F. Galvan Magaña, "Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle," *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, vol. 156, pp. 50–56, 2010.

[34] J. H. Zar, *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

[35] R. A. J. Celis and V. Labrada-Martagón, *Bioestadística, 3a edición.* . D.F.: Manual Moderno, 2014.

[36] IUCN, "IUCN Red List of Threatened Species.," vol. Version 20. 2014.

[37] G. Zúñiga-González, B. Gómez-Meda, A. Zamora-Pérez, M. Ramos-Ibarra, C. Batista-González, A. González-Rodríguez, J. Luna-Aguirre, and J. L. Rodríguez-Ávila, "Especies exóticas con micronúcleos espontáneos: alternativa para estudios de genotoxicidad.," *Nowet*, vol. 1, pp. 5–9, 2002.

[38] G. Zúñiga-González, O. Torres-Bugarín, J. Luna-Aguirre, A. González-Rodríguez, A. Zamora-Perez, B. Gómez-Meda, M. L. Ramos-Ibarra, A. Ramos-Mora, G. G. Ortiz, and M. P. Gallegos-Arreola, "Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species. ," *Mutat. Res.*, vol. 467, pp. 99–103, 2000.

[39] A. Zamora-Pérez, C. Camacho-Magaña, B. Gómez-Meda, M. Ramos-Ibarra, C. Batista-González, and G. Zúñiga-González, "Importance of spontaneous micronuceated erythrocytes in bottlenose dolphin Tursiops truncatus to marine toxicology studies," *Acta Biol. Hung.*, vol. 57, no. 4, pp. 441–448, 2006.

[40] L. R. Shugart, "DNA damage as a biomarker of exposure," *Ecotoxicology*, vol. 9, no. 5, pp. 329–340, 2000.

[41] J. S. Thomassiny and E. Chan, "Cambios en el uso de suelo.," in *Riqueza Biológica de Quintana Roo. Un Análisis para su Conservación.*, vol. 1, C. Pozo, N. Armijo, and S. Calmé, Eds. Quintana Roo: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)., 2011, pp. 132–135.

[42] D. M. Baker, E. Jordán-Dahlgren, M. A. Maldonado, and C. D. Harvell, "Sea fan corals provide a stable isotope baseline for assessing sewage pollution in the Mexican Caribbean," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 55, no. 5, pp. 2139–2149, 2010.

[43] G. Barrera-Escorcia and P. E. Namihira-Santillán, "Contaminación microbiológica en la zona costera de Akumal, Quintana Roo, México Microbiological contamination in the Akumal coastal zone, Quintana Roo State, Mexico," *Hidrobiológica*, vol. 14, no. 1, pp. 27–35, 2004.

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA ALMEJA SIFÓN *Panopea globosa* (DALL, 1898) EN EL SISTEMA LAGUNAR ENSENADA PABELLONES NAVOLATO, SINALOA.

*Góngora-Gómez, A.M., García-Ulloa-Gómez, M., Sotelo-Gonzalez, M.I., y Santamaría-Miranda, A.

Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-SINALOA) / Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101.

*Autor para correspondencia: gogam69@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN

La almeja "generosa" o de "sifón" *Panopea globosa,* fue reportada por Keen (1971) en el Golfo de California, México. Se caracteriza por poseer dos conchas equivalvas de un color blancuzco, cubiertas por un periostraco desde amarillo a café oscuro y/o negro. La composición bioquímica se relaciona con el proceso de gametogénesis, donde, existe una alta demanda de energía. El objetivo fue determinar la composición bioquímica en la almeja sifón *P. globosa*, y su relación con los parámetros ambientales en el sistema lagunar Ensenada Pabellones, Navolato Sinaloa. Se realizaron muestreos mensuales desde abril 2014 - abril 2015. Se tomaron los parámetros ambientales y se determinó la cantidad de sólidos suspendidos totales (SST), materia orgánica particulada (MOP) y clorofila *a* (Cl-*a*). Para proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), triglicéridos Kit comercial GPO-PAP y carbohidratos el método de Roe (1955). Las proteínas en gónada fueron de 127.8-336.9 mg/g y manto de 100.3-258.3 mg/g, para triglicéridos en gónada de 119.1-295.9 mg/g, manto de 121.6-246.4 mg/g, y para carbohidratos en gónada entre 85.8-100.4 mg/g, manto de 74.4-100 mg/g. Los resultados de la presente investigación nos da a conocer la relación que existe entre la composición bioquímica y los parametros ambientales.

Palabras clave: *Panopea globosa*; almeja sifón; bivalvos; Sinaloa; bioquímica.

INTRODUCCIÓN

La almeja "generosa" o de "sifón" *Panopea globosa*, fue reportada en el año de 1971 en el Golfo de California, específicamente en la Bahía San Felipe, Baja California y la Isla San Marcos, Baja California Sur México [1]. La distribución geográfica de este molusco se extiende desde el Golfo de California (Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa), hasta Nayarit, México [2; 3]. Esta almeja se caracteriza por poseer dos valvas (conchas) equivalvas de un color blancuzco, cubiertas por un periostraco desde amarillo a café oscuro y/o negro. Las valvas tienen forma oval y convexa, se encuentran truncadas en el extremo posterior, son frágiles y presentan líneas de crecimiento bien definidas. Las conchas pueden llegar a medir hasta 20-25 cm de longitud [4]. Estas características morfológicas son similares a las de *P. generosa*, por lo que es fácil confundirlas. La pecularidad que las hace diferente es el seno paleal. La impresión de esta huella en la concha de *P. generosa* es nula (no hay seno paleal), mientras que en *P. globosa* es amplia y bien definida [1; 3]. La composición bioquímica se encuentra relacionada con el proceso de gametogénesis, donde, existe una alta demanda de energía, tiempo durante el cual la transferencia de proteínas, lípidos y carbohidratos se produce a partir del músculo aductor y la glándula

digestiva hacia la gónada. La energía es almacenada como lípidos, proteínas y glucógeno antes del inicio de la gametogénesis, cuando el alimento es abundante, para posteriormente, ser utilizado en la maduración de los gametos cuando la demanda de energía es alta. El objetivo de la siguiente investigación fue determinar la composición bioquímica, como: proteínas, carbohidratos y triglicéridos en la almeja sifón *P. globosa*, y relacionarlos con los parámetros ambientales en el sistema lagunar Ensenada Pabellones, Navolato Sinaloa. Se realizaron muestreos mensuales desde abril 2014 - abril 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El sitio de recolecta fue ubicado en la Isla Los Redos, perteneciente al sistema lagunar Altata-Ensenada Pabellones, municipio de Navolato, Sinaloa (México), en el paralelo 24°30' latitud N y 107°48' longitud O [5; 6]

Medición de parámetros ambientales

Mensualmente (de abril-2014 a abril-2015), se midieron los parámetros ambientales: Temperatura del agua y oxígeno disuelto con un oxímetro (YSI, 55/12 FT, Ohio 45387), salinidad con un refractómetro de precisión (Amago, S/Mill) y potencial de hidrógeno con un potenciómetro (Hanna, HI 8314) [7]. Para la cuantificación de clorofila la (Cl *a*) se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita en Strickland y Parsons (1972) [8], y su cálculo se estimó con la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975) [9], La determinación de sólidos suspendidos totales (SST) y materia orgánica particulada (MOP) se realizó de acuerdo al método gravimétrico descrito por APHA (1995) [10].

Recolecta de los organismos

Cada mes se recolectaron de 15 a 40 organismos durante un año (abril 2014- abril 2015) mediante buceo autónomo y con la ayuda de una motobomba, la cual, arroja agua a presión hacia la arena a través de un tubo de plástico de 50 m de largo y 5 cm de diámetro, dejando los organismo descubiertos facilitando su recolecta sin afectarlos [11].

Análisis de la composición bioquímica

De cada muestreo mensual, se seleccionaron 15 almejas a las que se les extrajo una porción de manto y gónada, mismas que se seccionaron en fracciones pequeñas y se depositaron en microtubo Eppendorf de 2.0 ml, para finalmente, ser maceradas con un pistilo en un mortero. Se pesó aproximadamente 500 µg de muestra y se colocó en un microtubo Eppendorf de 2.0 ml. El resto de la muestra se almacenó a -25º C. Los microtubos Eppendorf con los 500 µg de muestra de tejido, se cubrieron con parafilm y se perforaron con una aguja, posteriormente, las muestras fueron liofilizadas durante 24 horas. Finalmente, las muestras fueron pulverizadas con la ayuda de una espátula. Se tomaron 200 µg de muestra y se colocaron en microtubos de 1.5 ml, y se hidrataron durante 24 horas, con 1 ml de solución salina fría (NaCl 35 ‰). Para la determinación de la concentración de las proteínas totales, se utilizó el método de Bradford (1976) [12], que se basa en la reacción de los grupos amino libres con el azul Comassie en presencia de ácido fosfórico y metanol. El complejo formado por la proteína y el colorante provoca un desplazamiento en la absorción máxima del colorante desde 465 a 595 nm. La determinación de triglicéridos totales se realizó utilizando el kit comercial GPO-PAP (Randox, Crumlin, Reino Unido). Este kit contiene una solución estándar, una solución reactiva y un buffer que se emplea para preparar la solución reactiva. Para la determinación de carbohidratos, se utilizó la técnica basada

en el método de Roe (1955) [13]. Una curva tipo fue elaborada utilizando dextrosa anhidra (Aprotec Mexicana, S.A. de C.V., Tijuana, B.C., México), de donde se tomaron 0.2 ml de homogenizado de cada muestra y se mezcló con 0.2 ml de Ácido Tricloro Acético (TCA) al 20 %, en tubos Eppendorf de 0.65 ml. Esto, con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos, para lo cual, se agregó 1 ml de Antrona.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros ambientales

La temperatura más baja se presentó durante el mes de noviembre 2014 (20.80 ± 0.58° C). El valor máximo se observó en el mes de agosto 2014 (31.31 ± 0.06° C), encontrándose un valor promedio de 25.17 ± 0.35° C (Figura 1). La salinidad presentó un valor mínimo de 30.67 ± 1.15 ups en el mes de septiembre 2014, el valor máximo se presentó en los meses abril y julio 2014, y febrero 2015 (36.00 ± 0.25 ups), encontrándose un valor promedio de 34.65 ± 0.39 ups (Figura 1).

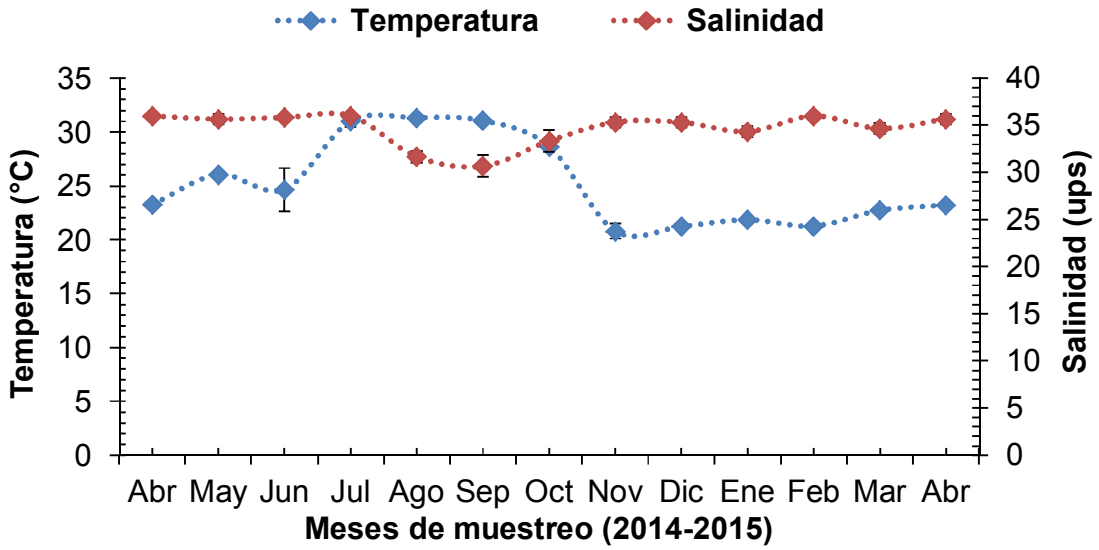


Figura 1.- Variación de la temperatura del agua (°C) y la concentración de salinidad (ups) durante los meses de muestreo (2014-2015) de la almeja sifón *P. globosa* en el sistema lagunar Ensenada Pabellones, Navolato, Sinaloa.

El oxígeno disuelto presentó el valor mínimo de 4.03 ± 0.05 mg L^{-1} en el mes de enero 2015 y el valor máximo en diciembre 2014 (6.63 ± 0.47 mg L^{-1}), encontrándose un valor promedio de 5.64 ± 0.369 mg L^{-1} (Figura 2). El valor más bajo del pH se presentó en el mes de marzo 2015 (6.76 ± 0.14 UpH) y el valor más alto en los meses de julio 2014 y febrero 2015 (8.43 ± 0.09 UpH), con un valor promedio de 7.83 ± 0.09 UpH (Figura 2).

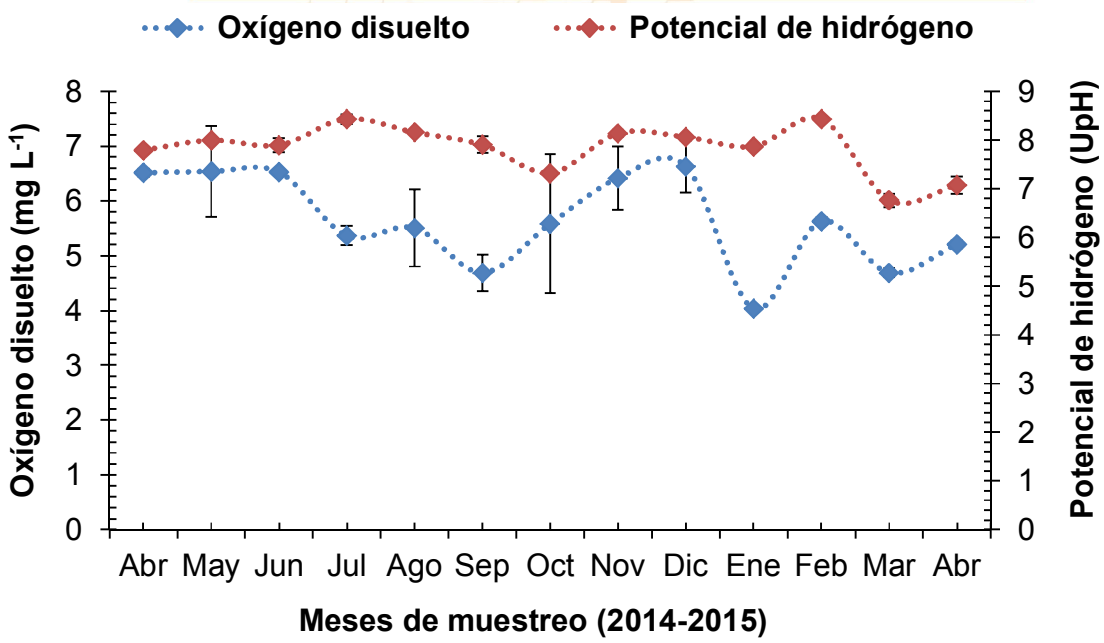


Figura 2.- Variación de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) y potencial de hidrógeno (UpH) durante los meses de muestreo (2014-2015) de la almeja sifón *P. globosa* en el sistema lagunar Ensenada Pabellones, Navolato, Sinaloa.

La menor concentración de (Cl *a*) fue observada en el mes de abril 2015 (1.9 ± 0.01 mg m^{-3}) y la mayor en el mes de agosto 2014 (5.1 ± 1.15 mg m^{-3}), con un promedio de 3.9 ± 1.13 mg m^{-3} (Figura 3). El valor mínimo de SST se encontró en el mes de abril 2015 (12.7 ± 0.18 mg L^{-1}) y el valor máximo en el mes de agosto 2014 (51.10 ± 0.57 mg L^{-1}). El valor mínimo de MOP fue encontrado en el mes de agosto 2015 (1.5 ± 0.06 mg L^{-1}) y el valor máximo en el mes marzo 2015 (16.1 ± 0.10 mg L^{-1}) (Figura 3).

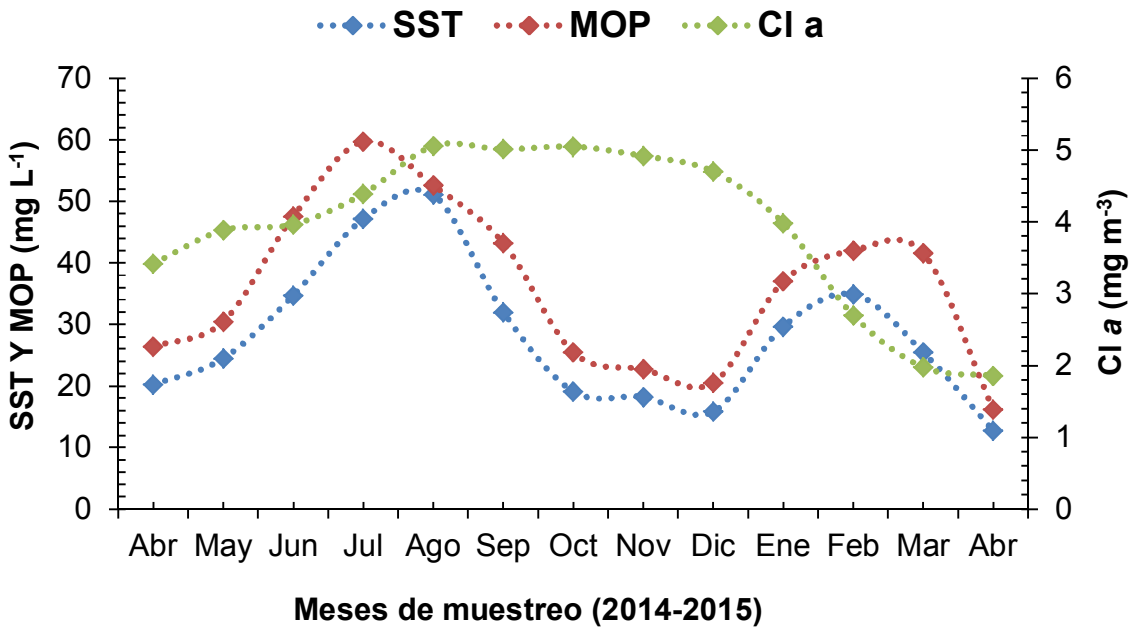


Figura 3.- Variación de la concentración de Cl *a* (mg m $^{-3}$), SST (mg L $^{-1}$) y MOP (mg L^{-1}), durante los meses de muestreo (2014-2015) de la almeja sifón *P. globosa* en el sistema lagunar Altata- Pabellones, Navolato, Sinaloa.

Composición bioquímica

Proteínas totales

La concentración de proteínas totales en el manto fue menor en el mes de abril 2015 (100.3 ± 5.2 mg g-1), mientras que la mayor concentración se observó en el mes de junio 2014 (258.3 ± 30.0 mg g-1). La concentración de proteínas totales en la gónada fue menor en el mes de abril 2015 (127.8 ± 26.9 mg g-1), mientras que la mayor concentración se obtuvo en el mes de febrero 2015 (336.9 ± 101.2 mg g-1;) (Figura 4).

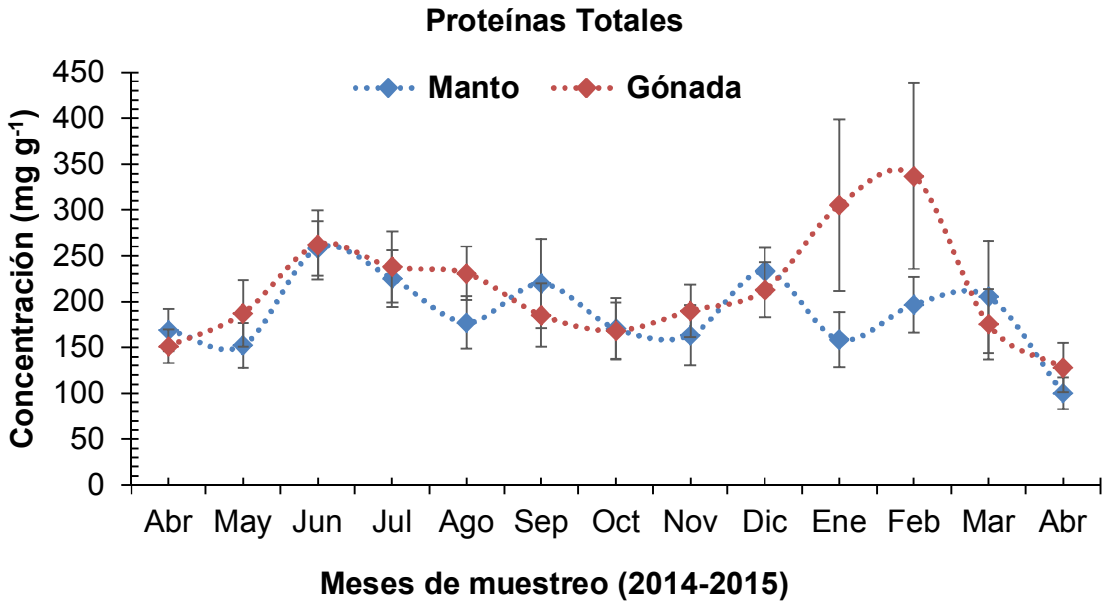


Figura 4.- Variación de la concentración de proteínas totales en manto y gónada, durante los meses de muestreo (2014-2015) de la almeja sifón *P. globosa* en el sistema lagunar Ensenada Pabellones, Navolato, Sinaloa.

Triglicéridos totales

La concentración de triglicéridos totales en el manto fue menor en el mes de enero 2015 (121.6 ± 36.6 mg g^{-1}), mientras que la mayor concentración se observó en el mes de febrero 2015 (277.5 ± 63.3 mg g^{-1}). La concentración de triglicéridos totales en la gónada fue menor en el mes de febrero 2015 (119.1 ± 29.1 mg g^{-1}), mientras que la mayor concentración se obtuvo en el mes de abril 2015 (295.0 ± 58.3 mg g^{-1}) (Figura 5).

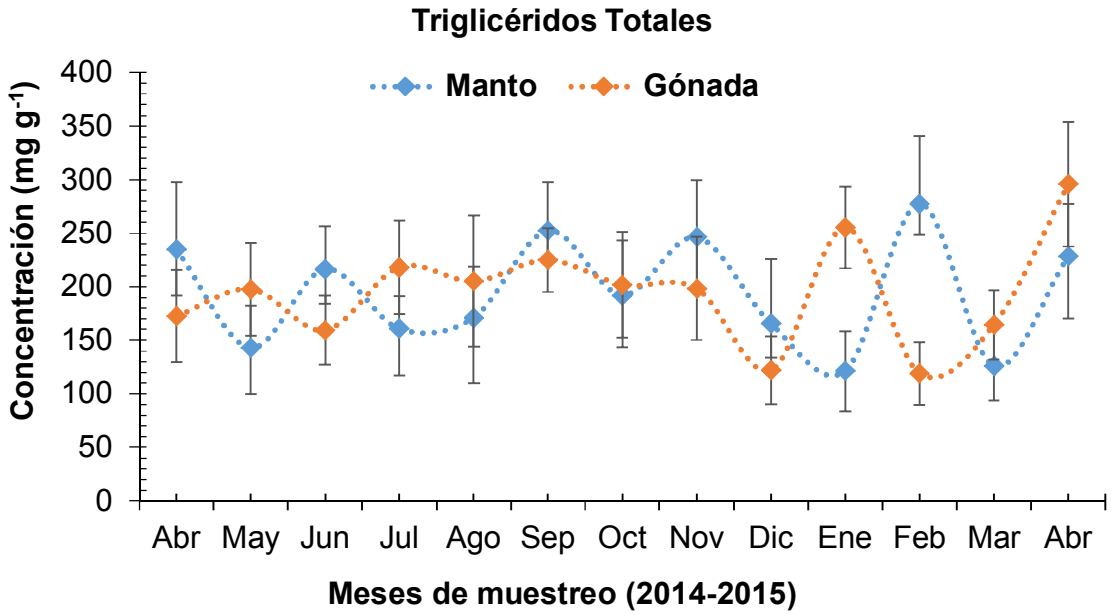


Figura 5.- Variación de la concentración de triglicéridos totales en manto y gónada, durante los meses de muestreo (2014-2015) de la almeja sifón *P. globosa* en el sistema lagunar Ensenada Pabellones, Navolato, Sinaloa.

Carbohidratos totales

La concentración de carbohidratos totales en el manto fue menor para el mes de abril 2014 (74.4 ± 6.5 mg g^{-1}), mientras que la mayor concentración (100.0 ± 8.0 mg g^{-1}) fue observada en el mes de marzo 2015. Por otro lado, la menor concentración de carbohidratos totales en la gónada (88.2 ± 5.5 mg g^{-1}) fue obtenida para el muestreo del mes de noviembre 2014, mientras que la mayor concentración (100.4 ± 5.2 mg g^{-1}) en el mes de febrero 2015 (Figura 6).

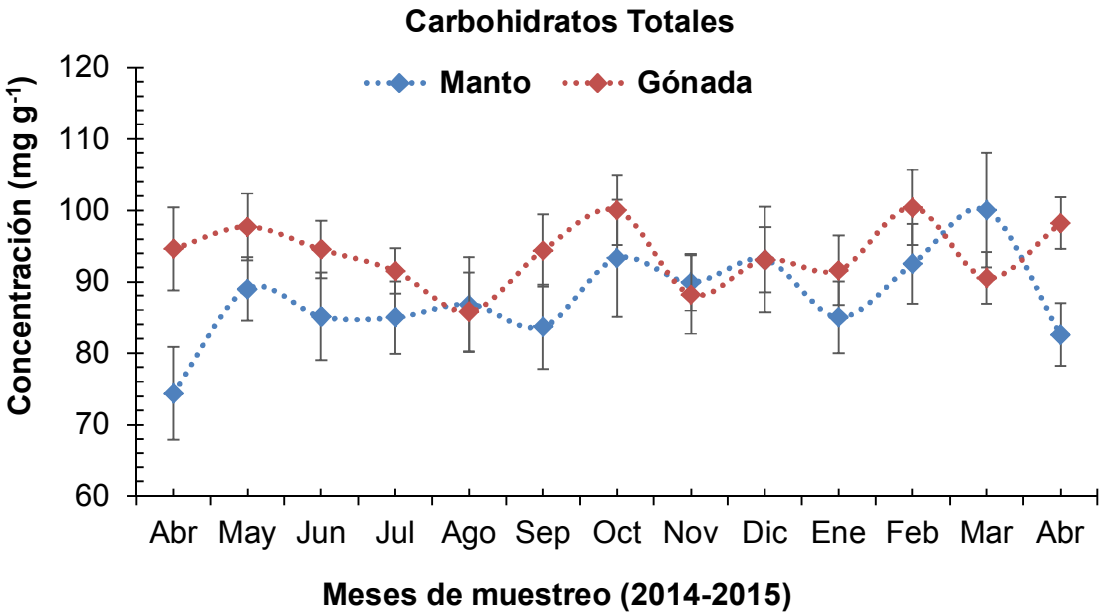


Figura 6.- Variación de la concentración de carbohidratos totales en manto y gónada, durante los meses de muestreo (2014-2015) de la almeja sifón *P. globosa* en el sistema lagunar Ensenada Pabellones, Navolato, Sinaloa.

Bayne (1976) [14] describe de manera genérica la distribución de la energía en moluscos bivalvos y cómo se transfiere entre sus diferentes componentes corporales, específicamente, para sustentar el evento reproductivo. La almeja sifón *P. globosa* presenta una forma de vida muy particular, diferente a la mayoría de los bivalvos [15], ya que la mayor parte de su vida vive enterrada en el sustrato y sólo extiende su sifón fuera del sustrato para captar alimento y expulsar desechos o gametos durante el periodo reproductivo [15]. Su forma de vida y la morfología distinta de esta especie, explican en gran medida los resultados observados en el presente estudio, que indican fuertes diferencias en la composición bioquímica de sus componentes corporales en comparación con la de otros organismos bivalvos. Oliveira *et al.* (2011) [16] y Cruz-Gómez (2012) [15] en su estudio con *P. abrupta* y *P. globosa*, respectivamente, reportan al igual que en el presente trabajo, que el manto es el principal reservorio energético, tanto para el evento reproductivo como para el crecimiento. Por otro lado, la gónada es uno de los principales componentes corporales con más triglicéridos, esto se debe a que éste órgano requiere de mayor energía necesaria en la maduración gonádica y eficiente durante el evento reproductivo [17; 18; 15].

CONCLUSIONES

La mayor concentración de proteínas y triglicéridos en gónada y manto se presentaron en febrero 2015 y abril 2014 respectivamente. La mayor concentración de carbohidratos totales en gónada y manto se presentó en los meses febrero-marzo, 2015.

Los resultados de la presente investigación nos dan a conocer la relación que existe entre la composición bioquímica y los parámetros ambientales en Ensenada Pabellones, Navolato, Sinaloa.

REFERENCIAS

[1] A. M. Keen. "Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru". Stanford University Press. California.1064 p, 1971.

[2] S.S. González-Peláez, E. Morales-Bojorquez, D. B. Lluch-Cota, S. M. Lluch-Cota y J. Bautista-Romero. "Modelling geoduck growth: Multimode inference in *Panopea globosa* from the southwestern Baja California Peninsula, México". Journal of Shellfish Research, 34 (1): 101-112, 2015.

[3] A. M. Góngora-Gómez, M. I. Sotelo-Gonzalez, J. A. Hernández-Sepúlveda, A. L. Domínguez-Orozco y M. G. Ulloa-Gómez. "Nuevo registro de la almeja generosa *Panopea globosa* (Dall, 1898) (Bivalvia: Hiatellidae) en el estado de Sinaloa, México". Lat. Am. J. Aquat. Res., 44 (2): 411-415, 2016.

[4] E. Martínez y Martínez. "Segunda sección poder ejecutivo. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación". DOF: 9 Sep. 29-30 pp, 2013.

[5] Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Atlas geológico de uso de suelo. Mapa de tipos de vegetación y su distribución". Sarh, México, D. F. 450 pp. 1979.

[6] A. M. Góngora-Gómez, M. García-Ulloa, A. L. Domínguez-Orozco y J. A. Hernández-Sepúlveda. "Crecimiento del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) cultivado a diferentes densidades". Avances de Investigación Agropecuaria. 15 (2): 79.94, 2011.

[7] E. Álvarez-Dagnino. "Características fisiológicas de la almeja chocolata *Megapitaria squa*lida (Sowerby, 1835) en Altata, Navolato, Sinaloa: Factores metabólicos en cultivo y factores reproductivos en una población silvestre". Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. IPN-CIIDIR, Unidad Sinaloa. 68 p, 2015.

[8] J. D. Strickland y T. R. Parsons. "A practical handbook for the Seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada". Ottawa. 310, 1972.

[9] S. W. Jeffrey y G. F. Humphrey "New spectrophotometric equation for determining chlorophyll". a, b, c1 and c2 Biochem. Physiol. Pflanz., 167, 194-204. 1975.

[10] APHA awwa WEF. "Standard Methods for the examination of water and wastewater". 19thEdition. American Public Health Association. Washington, D. C. Me coliform group. CAP- 9221., 1995.

[11] E. M. Arámbula-Pujol, A. R. García-Juárez., E. Alcántara-Razo y E. A. Aragón-Noriega. "Aspectos de biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California". Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S, México. Hidrobiológica 18 (2): 89-98, 2008.

[12] M. M. Bradford. "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding". Anal Biochem. 72: 248-54, 1976.

[13] J. H. Roe. "The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent". J. Biol. Chem. 212-335, 1955.

[14] B. L. Bayne. "Aspects of reproduction in bivalve mollusks. En: Vieley ML (eds) Estuarine Processes". New York. NY: Academy Press. 432, 48, 1976.

[15] L. M. Cruz-Gómez. "Ciclo anual de la condición nutricional en la almeja generosa, *Panopea globosa*, de bahía Magdalena B. C.S. México". Tesis de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biólogicas del Noroeste: México. 54 p, 2012.

[16] A. C. M. Oliveira, P. J. Bechtel, D. X. Nguyen, L. Gurer, C. A. Crapo, Q. Fong y R. Rolande. "Chemical and texture of commercial geoduck clams (*Panopea abrupta*) Harvested is southeast Alaska". Source: Journal of Shellfish Research, 30 (3): 761-769., 2011.

[17] C. Ruiz-Verdugo, S. K. Allen y A. M. Ibarra. "Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catharina scallop (*Argopecten ventricosus*)". Aquaculture 201: 19-33, 2001.

[18] I. S. Racotta, J. L. Ramírez, S. Ávila y A. M. Ibarra. "Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop. *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems". Aquaculture. 163: 11-122, 1998.

EMBRIOGÉNESIS DEL CARACOL COBO DEL PACÍFICO *Strombus gracilior* (STROMBIDAE) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO DURANTE LA ÉPOCA REPRODUCTIVA.

*Hernández-Sepúlveda, J.A., Góngora-Gómez, A.M., Villanueva-Fonseca, L.Z., Humberto-Sepúlveda, C.

Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-SINALOA) / Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101.

*Autor para correspondencia: juanhese@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN

El caracol "Cobo del Pacífico Oriental", *Strombus gracilior*, presenta una concha biconica con una espira provista de espinas, superficie externa café-amarillenta, abertura blanco-azulada, con una talla máxima de 9.5 cm y común hasta 6.5 cm. Habita en bancos arenosos, desde la zona intermareal hasta unos 45 m. Si bien la importancia comercial de esta especie es menor a aquella atribuida a otras especies de gasterópodos como *Melongena patula, Muricanthus nigritus* y *Phyllonus erythrostoma*, su pesquería representa una fuente laboral y alimenticia para los habitantes de la región del Pacífico. El objetivo de la siguiente investigación fue contribuir al conocimiento del desarrollo embrionario de *Strombus gracilior* en condiciones de laboratorio. Diez y ocho masas ovigeras fueron recolectadas en el Golfo de California entre los límites de los estados de Sonora y Sinaloa, México y posteriormente trasladadas al laboratorio donde fueron colocados en acuarios de 10 litros con agua de mar. La longitud total estimada de una sola masa ovígera fue de 11.95 m, el número promedio de embriones encontrados en 2 cm fue 253, obteniéndose un total de 157 500 embriones en toda la masa de huevos. Este trabajo constituye el primer reporte sobre el desarrollo embrionario de *Strombus gracilior.*

Palabras clave: *Strombus gracilior,* Strombidae, Masas ovígeras, Acuicultura, México.

INTRODUCCIÓN

El caracol "Cobo del Pacífico Oriental" o “Lancetilla del Pacífico", *Strombus gracilior* (Sowerby, 1825), presenta una concha biconica con una espira alta provista de espinas, vuelta del cuerpo lustrosa y casi lisa, labio externo liso, superficie externa café-amarillenta, abertura blanco-azulada, bordeada de naranja, Con una talla máxima de 9.5 cm y común hasta 6.5 cm. Habita en bancos arenosos y lagunas lodosas, desde la zona intermareal hasta unos 45 m [1]. Es una de las cuatro especies de moluscos gasterópodos del género *Strombus* distribuidos ampliamente atreves del Golfo de California hasta Perú [2] [1]. Si bien la importancia comercial de esta especie es menor a aquella atribuida a otras especies de gasterópodos como *Melongena patula*, *Muricanthus nigritus* y *Phyllonus erythrostoma,* su pesquería representa una fuente laboral y alimenticia para los habitantes de la región del Pacífico. En México, se extrae de manera artesanal mediante el marisqueo y buceo con compresor en las costas del Golfo de California [2]. La concha de estos caracoles fue utilizado en la época de los aztecas como adorno en pectorales, collares y pulseras, así como como un importante si no es que crucial hábitat para numerosas especies de moluscos y artrópodos. Esencialmente, las agregaciones reproductivas de

caracol actúan como arrecifes temporales, proveyendo substrato, refugio y alimento en una región donde los substratos rocosos no son abundantes. En algunas comunidades de Brasil las conchas y el opérculo de *Strombus* sp eran utilizados en la zooterapia: para la caída más rápida de los dientes, para el mal de ojo y como afrodisiaco [3]. Hoy en día el caracol representa una fuente de alimento, trabajo y de artesanías para los habitantes de la región del Golfo de California. Este trabajo constituye el primer reporte sobre el desarrollo embrionario del caracol "Cobo del Pacífico", *Strombus gracilior* y donde los distintos estados de desarrollo embrionario siguen el patrón normal descrito para otros moluscos Strombidos [4], [5], [6]. Con estos resultados se podrá promover la explotación de otras especies de moluscos gasterópodos de importancia económica y favorecer el desarrollo socioeconómico de las comunidades costeras. El objetivo de la presente investigación fue describir el desarrollo embrionario del caracol cobo *Strombus gracilior* en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento del agua de mar

El agua de mar fue tratada con un filtro de arena (Baker Hydro, modelo TSF-24), filtros de cartucho de polipropileno y celulosa (Cole Parmer) con una capacidad de retención de 25, 15 y 5 µm. Finalmente el agua pasó por una batería de luz ultravioleta [7], [8], [6].

Recolecta y establecimiento de las masas ovígeras

El sitio de muestreo seleccionado se ubicó dentro del Golfo de California (26° 22' N y 109° 17' W), entre los límites de los estados de Sonora y Sinaloa. En este sitio se colocó un transecto de 20 m de longitud y 20 m de ancho, dentro de esta área y mediante buceo con compresor se localizaron a las hembras que se encontraban ovopositando sobre arena fina y la macroalga *Enteromorpha intestinalis*, posteriormente se procedió a obtener las masas ovígeras, a fin de asegurar la frescura de la masa, estimar el momento de eclosión y asegurar que se tratase de la especie objeto de estudio. Inmediatamente éstas fueron colocadas en contenedores de plástico con agua de mar a 26ºC y salinidad de 36‰. Posteriormente, fueron trasladadas al laboratorio teniendo cuidado que durante el traslado la temperatura no rebasara los 32ºC (Góngora-Gómez *et al.* 2007).

Sistema de mantenimiento de las masas ovígeras

Las masas ovigeras fueron colocadas en un acuario de 10 l con agua de mar previamente filtrada y esterilizada con luz UV. Se aplicó aireación y calefacción al agua para conservar la temperatura a 28ºC. Se tomaron lecturas periódicas de pH, salinidad y temperatura [6].

Obtención, limpieza y observación de las masas ovígeras

Las masas ovígeras obtenidas fueron tamizadas con la ayuda de un colador de 1 mm de luz de malla para eliminar el exceso de arena. Con la finalidad de eliminar protozoarios y otras especies indeseables se procedió a pasar las masas de huevos por cuatro contenedores, el primero de ellos con una solución de cloro comercial (NaClO) y agua de mar filtrada al 0.2% entre 30 y 40 s. Inmediatamente después se colocaron en otros tres recipientes conteniendo agua de mar filtrada para eliminar la solución de cloro [8], [6].Las masas ovígeras fueron observadas bajo un microscopio óptico de campo oscuro para verificar que los huevos fueran fértiles, viables, y que se encontraran en el mismo estadio de desarrollo, es decir con la membrana de fertilización presente.

Incubación

La masa de huevos fue desplegada y fraccionada en 10 secciones de 2 cm para contar el número de embriones presentes en cada fracción y en toda la masa ovígera. Cada fracción se colocó en un vaso de precipitado de 1 000 ml con agua de mar filtrada, se aplicó aireación y calefacción al agua para conservar la temperatura a 28ºC y la salinidad de 36‰, esto para llevar a cabo el desarrollo embrionario y posteriormente la eclosión. Se tomaron lecturas diarias de salinidad, pH y temperatura [8], [6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados promedio de los parámetros fisicoquímicos del agua fueron los siguientes: Temperatura 28°C, oxígeno disuelto 6.09 mg/L^{-1}, salinidad de 30 Ups y pH 7.8 UpH.

Las conchas de los gasterópodos strombidos carecen de dimorfismo sexual, por lo que para la determinación del sexo, es necesario observar las partes blandas buscando la presencia o ausencia de pene. Las hembras depositaron las masas ovígeras, formando una gran freza, las cuales son cubiertas con granos de arena.

El tamaño de una masa ovígera fue de 11.95 m de largo. De las 20 fracciones eclosionadas se tomaron 10 al azar para realizar el conteo de los cigotos, de las cuales se obtuvo un promedio de 253 embriones en 2 cm, con un total de 157,500 embriones en una masa ovigera. Se observaron las etapas del desarrollo embrionario como: huevo fertilizado, primera división, gástrula, larva trocófora y larva véliger, con un tiempo de eclosión de 7 - 8 días a una temperatura de 28°C (Figura 1 a-d). Durante el desarrollo larval se observó la aparición de estructuras como el pie, opérculo, el canal sifonal, la aparición del corazón larval, el desarrollo de la primera voluta y finalmente el velum bilobulado, junto con el asentamiento de la larva (Figura 2 a-d). Con un porcentaje del 90% de asentamiento larval.

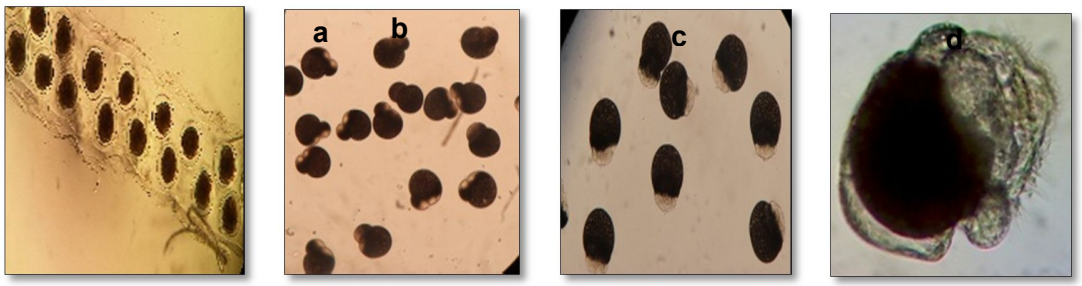


Figura 1.- Desarrollo embrionario: a) Fracción de masa ovígera. b) Primera división. c) Gastrulación. d) Larva Trocófora.

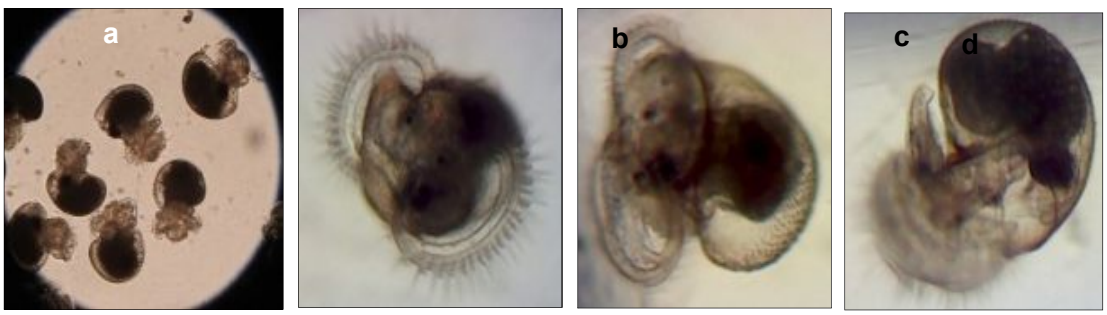


Figura 2.- Desarrollo larval: a) Larva Preveliger. b - d) Larva Veliger.

La longitud de la masa ovígera para *S. gracilior* en este estudio y el número de embriones por masa ovígera, así como el número de éstos por mm, se pueden considerar que el promedio en este estudio coincide con lo registrado para otros strombidos. *S. costatus* presenta una longitud en la masa de huevos de 13.2-15 m, el número total de embriones por masa ovígera fue de 185 000-210 000 y de 14 cigotos por mm [4]; mientras que *S. gigas* presenta una longitud en la masa ovígera de 24-37 m, el número total de embriones en toda la masa fue de 300 000-750 000 y con 12-15 cigotos por milímetro [9]. *S. raninus* muestra una longitud en la masa ovígera de 20 m, el número total de embriones en toda la masa fue de 400 000-460 000 y con 20-23 cigotos por milímetro [4]. *S. pugilis* presenta una longitud en la masa ovígera de 11.24 m, el número total de embriones en toda la masa fue de 148 368 y con 13 cigotos por milímetro [8]. En el presente estudio se observó una longitud en la masa ovígera de 11.95 m de largo, con un total de 157 500 embriones en toda la masa ovigera y de 12 cigotos por milímetro.

Fecundidades altas en animales van acompañadas de mortalidades larvales altas [10]. Una hembra, en promedio, produce tal cantidad de huevos durante su ciclo de vida que asegura que al menos una hembra de su descendencia sobreviva y se reproduzca, [10]dedujo de estudios sobre fecundidad, estructura de tallas y conteo de jóvenes de *Thais lamellosa* (Gmelin, 1791). La temperatura tiene un impacto significativo en el desarrollo larvario, este hecho es claro en los estudios realizados con otras especies de strombidos: como lo ocurrido para *S. costatus* (Gmelin, 1791) a una temperatura del agua de 28 ºC, el desarrollo tomó 100 h hasta la eclosión, el periodo de desarrollo de *S. gigas* para esa misma temperatura hasta la fase de eclosión tarda solamente 82.5 h, para *S. raninus* (Gmelin, 1791) la eclosión resultó ser de 80 h. mientras que para *S. pugilis* el tiempo registrado de eclosión a esa misma temperatura resulto ser de 70 h [6]. En el presente trabajo el tiempo registrado de eclosión para *S. gracilior* a una temperatura de 28 ºC resultó ser de 168 h. La comparación entre estas especies se realizó con base en que éstas son las que representan una fuente laboral y alimenticia para los habitantes de la región caribeña y el Golfo de California.

CONCLUSIONES

Este trabajo constituye el primer reporte sobre el desarrollo embrionario del caracol "Cobo del Pacífico", *Strombus gracilior* en donde los distintos estados de desarrollo embrionario siguen el patrón normal descrito para otros moluscos Strombidos. Con estos resultados se podrá promover la explotación de esta especie de molusco gasterópodo de importancia económica y favorecer el desarrollo socioeconómico de las comunidades costeras.

REFERENCIAS

[1] Kerstitch, A. & H. Bertsch. 2007. Sea of Cortez marine invertebrates 2ª. Edition. Monterrey, California, U.S.A. 124 p.

[2] FAO. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol 1: Plantas e invertebrados. Roma, Italia. 664 p.

[3] Costa-Neto, E. M. 2006. Os moluscos na zooterapia: medicina tradicional e importancia clínico-farmacológica. Revista Biotemas, 19 (3): 71-78.

[4] Robertson, R. 1959. Observation on the spawn and veligers of conch (*Strombus*) in the Bahamas. Proc. Malac. Soc. Lond. 33: 164-171.

[5] Arroyo-Mora, E. M. 2003. *Strombus galeatus*: Descripciones biológicas de un caracol en riesgo. El caracol *Strombus gigas*: Conocimiento integral para su manejo sustentable en el Caribe. 29-35.

[6] Góngora-Gómez, A. M; A. L. Domínguez-Orozco; N. P. Muñoz-Sevilla & L. A. Rodríguez-Gil. 2007. Obtención de masas ovígeras del caracol lancetilla, *Strombus pugilis* (Mesogastropoda: Strombidae) en condiciones de laboratorio. Rev. Biol. Trop. 55 (1): 183-188.

[7] Rodríguez, G. A. 1995. Eclosión del caracol de leche, *Strombus costatus* basado sobre el desarrollo embrionario. Rev. del Centro de Graduados e Invest. I.T.M 23: 1-18.

[8] Góngora, G. A. 1999. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario del caracol marino *Strombus pugilis* (L). Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 38 p.

[9] Hahn, K. O. 1989. Culture of queen conch, *Strombus gigas*, in the Caribbean. Pages 317-330 in: *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.

[10] Spight, T. M. 1976. Ecology of hatching size for marine snails. Oecologia, Berlin. 24: 283-294.

DESARROLLO GAMETOGÉNICO DEL OSTIÓN DE PLACER *Crassostrea corteziensis* (HERTLEIN, 1951), DURANTE UN CICLO DE CULTIVO, EN EL ESTERO LA PITAHAYA, GUASAVE, SINALOA.

*Góngora-Gómez, A.M., Humberto-Sepúlveda, C., Sotelo-González, M.I., García-Ulloa-Gómez, M.

Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-SINALOA) / Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101.

*Autor para correspondencia: gogam69@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis,* es una especie que tiene un lugar económico importante en el mercado nacional por su alto valor comercial. Como consecuencia de su explotación, han desaparecido bancos naturales de éste recurso, convirtiéndose en un candidato ideal para la acuacultura. El objetivo del trabajo fue relacionar los parámetros físico-químicos, con el desarrollo gametogénico de *C. corteziensis,* durante un ciclo de cultivo en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa. Se utilizó un sistema de cultivo "long line". Se realizaron muestreos mensuales desde ago 2014 – feb 2016. Mensualmente, se tomaron parámetros físico-químicos y muestras de agua para la determinación de sólidos suspendidos totales (SST), materia orgánica particulada (MOP) y clorofila *a* (Cl*a*). Se realizó un análisis histológico de las gónadas con la tinción hematoxilina-eosina. Se observaron seis etapas en el desarrollo gonadal: Indiferenciado, gametogénesis inicial y avanzada, maduración, desove y post-desove. La etapa de maduración de machos y hembras se observó en el mes de junio 2015. Se encontró una proporción sexual de H:M = 0.75:1. El desove se registró de mayo-octubre 2015; en estos meses se presentaron los gradientes más altos de temperatura, lo que sugiere que este parámetro influyó mayormente en el desove de los organismos.

Palabras clave: *Crassostrea corteziensis;* Ostión de placer; acuacultura; gametogénesis; Sinaloa.

INTRODUCCIÓN

La acuacultura es una actividad que permite la producción de cantidades masivas de alimentos con un alto valor proteico a bajo costo. En México, la acuacultura es relativamente creciente y en expansivo, sus expectativas de crecimiento deben de ser fomentadas con absoluto conocimiento de su potencial y equilibrio con el medio en que se pretende desarrollar. Para el año 2011 se obtuvo una producción nacional de 43, 757 toneladas de ostión, de las cuales Sinaloa junto con los estados de Sonora, Jalisco y Michoacán aportó 282 toneladas [1]. Para México, se encuentran reportadas siete especies de ostión entre nativas e introducidas, de las cuales, tres de ellas aportan la mayor producción a nivel nacional. Las de mayor interés económico relacionado al cultivo, son el ostión europeo *C. virginica*, el ostión de placer *C. corteziensis* y el ostión japonés *C. gigas*. México ocupa el cuarto lugar en la producción de moluscos bivalvos en América Latina, después de Chile, Brasil y Perú, siendo *C. virginica*, *C. gigas*, *C. sikamea* y *C. corteziensis,* las especies que más se cultivan [2].

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, es una especie que tiene un lugar económico importante en el mercado regional y nacional por su alto valor comercial. Esta especie es nativa del noroeste mexicano, tradicionalmente se ha capturado en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. Como consecuencia de su explotación excesiva, han desaparecido bancos naturales de éste recurso, convirtiéndose en un candidato ideal para la acuacultura intensiva y para la producción de semilla en laboratorio [3]. La técnica histológica es el conjunto de aplicaciones y operaciones destinadas a demostrar la disposición estructural de los tejidos y tiene como objetivo, aplicar métodos o procedimientos que permitan evidenciar estructuras a nivel microscópico. Su utilidad dentro de la biología radica en la realización de estudios en procesos reproductivos, desarrollo embrionario larval, anatomía microscópica y patología, entre otros [4].

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento del agua de mar

El sitio de estudio fue el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa. Se utilizó un sistema de cultivo "Long line". Se sembraron 5,000 ostrillas de *C. corteziensis* en el cultivo experimental, previamente certificadas y provenientes del laboratorio CREMES, las cuales, se transportaron durante 2 horas en una caja de corcho de 20 X 20 cm en seco y frío. El tamaño inicial de cada ostrilla osciló entre 3 y 4 mm.

Se realizaron muestreos desde agosto 2014 – febrero 2016. Mensualmente y con la ayuda de un nucleador (esto para tener una muestra representativa de toda la columna de agua), se midieron *in situ* los siguientes parámetros fisicoquímicos: Temperatura y oxígeno disuelto del agua usando un oxímetro (YSI, 55 / 12 FT, Ohio 45387); un refractómetro de precisión (Atago, S/Mill) para la salinidad; el potencial de hidrógeno (pH) se midió con un potenciómetro (Hanna, HI 8314); la transparencia y la profundidad se determinaron con un disco Secchi; y para la temperatura ambiente se utilizó un termómetro (Brannan 76 mm inmersión de -20 a 10 ºC) [5]. Adicionalmente, se tomaron muestras de agua de mar con una botella Niskin y se transportaron al Laboratorio de Malacología del IPN-CIIDIR-Unidad Sinaloa, para la determinación de SST y MOP, de acuerdo al método gravimétrico descrito por APHA (1995) [6]. Para la cuantificación de clorofila *a* (Cl *a*) se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita en Strickland y Parsons (1972) [7], y su cálculo se estimó con la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975) [8].

Análisis histológico de las gónadas

El análisis histológico, se llevó a cabo mediante la tinción hematoxilina-eosina descrito por Chávez-Villalba *et al.* (2008) [9]. Se tomaron muestras de 30 ostiones mensualmente, de los cuales se seleccionaron 15 gónadas. Para realizar la fijación de la gónadas se les inyecto solución Davidson y se mantuvieron en esta solución de 24 a 72 h, posteriormente, se les adicionó alcohol al 70 % para su permanencia hasta llevar a cabo su análisis histológico. Las muestras conservadas en alcohol al 70 % fueron seccionados de manera longitudinal, así como también por la parte ventral para obtener fragmentos de tejido que incluyeron principalmente gónadas; posteriormente se depositaron en cassettes. A cada uno de los cassettes se le asignó una clave (rotulación) para su identificación. Estos fueron acomodados en una canastilla de transporte y depositados en el carrusel del deshidratador de tejidos. Las inmersiones de los tejidos se realizaron incrementando el grado de alcohol en los vasos, iniciando con alcohol etílico al 70, 80, 96 y 100 %, respectivamente; después, se llevó a cabo la inmersión de los tejidos en xilol para luego ser embebidos en parafina líquida a fin de lograr la infiltración de ésta a nivel celular. Se utilizaron vasos por cada reactivo para lograr una mejor deshidratación. Posterior a la deshidratación, los tejidos se retiraron de las canastillas y se colocaron en el centro de un molde de metal, para ser embebidos en parafina líquida después ser depositaron en una

cama de hielo, y así, al enfriarse y solidificarse, formar un bloque. Se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor. Las secciones montadas en los portaobjetos fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina. Las muestras procesadas por histología fueron analizadas cualitativamente utilizando un microscopio Olympus (cx-31, 10x) para realizar las observaciones en la gónada. Se determinó la predominancia de los estadios de maduración, así como su respuesta abundancia, y la predominancia de los ovocitos y espermatozoides correspondientes a los diversos estadios de madurez gonadal, para finalmente, obtener el nivel de madurez gonádica del organismo con respecto a cada mes de confinamiento en el cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros fisicoquímicos

La temperatura del agua osciló de 18.8 a 33 °C, la salinidad entre 24.5 y 38.5 ups, el oxígeno disuelto de 3.76 a 6.44 mg L^{-1}, el pH registrado fue de 7.12 a 8.63 UpH, la profundidad varió de 2.2 a 0.7 m y la transparencia de 0.2 a 0.9 m. Los SST oscilaron entre 23.7 y 68.93 mg L^{-1}, MOP de 2.76 a 19.6 mg L^{-1} y la clorofila *a* de 3.42 a 14.15 mg m^{-3}.

Análisis histológico de las gónadas

Basándose a los criterios propuestos por [9], dicha escala comprende 6 etapas que se exponen a continuación: Indiferenciado (Figura 1 a y 2 a), gametogénesis inicial (Figura 1 b y 2 b), gametogénesis avanzada (Figura 1 c y 2 c), maduración (Figura 1 d y 2 d), desove (Figura 1 e y 2 e) y post-desove (Figura 1 f y 2 f).

Ciclo reproductivo de hembras en C. corteziensis

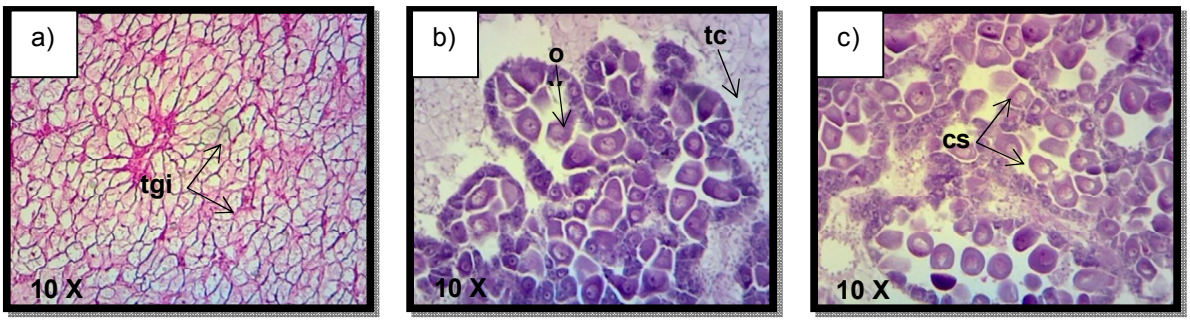


Figura 1. a) Gónada en etapa de indiferenciado: Se observan restos de tejido gonádico indiferenciado

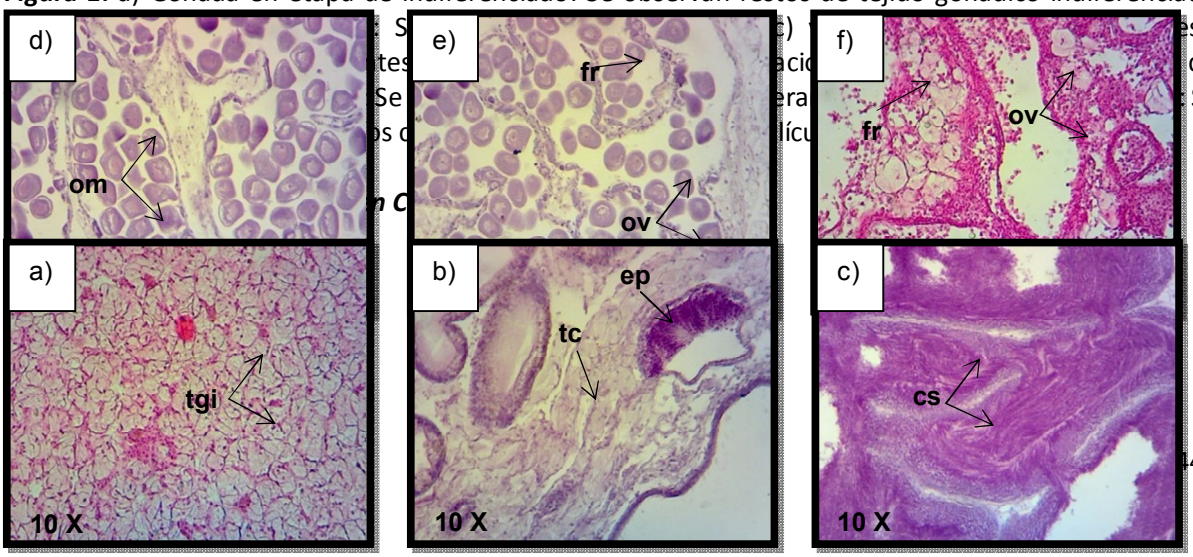


Figura 2. a) Gónada en etapa de indiferenciado: Se observan restos de tejido gonádico indiferenciado (tgi). b) Gametogénesis inicial: Se observa tejido conectivo (tc) y espermatozoides (ep). c): Gametogénesis avanzada: Se observan abundantes células sexuales (cs). d) Maduración: Se observan las masas de espermatozoides (ep). e) Desove: Se rompen los folículos (fr) y se liberan los espermatozoides (ep). f) Post-desove: Se observan grandes espacios vacíos con restos de espermatozoides (ep) y los folículos se aprecian muy rotos (fr).

La etapa de maduración de machos y hembras se observó en el mes de junio 2015. Se encontró una proporción sexual de H:M = 0.75:1. Resultados que concuerdan con Chávez-Villalba *et al.* (2008) [9] para *C. corteziensis* en Sonora, México. *C. corteziensis* presentó una actividad reproductiva durante los meses de mayo-octubre 2015, con dos periodos principales de desove en julio y octubre 2015. La primera fase del ciclo gametogénico (indiferenciado) se presentó durante los meses de noviembre 2015 – febrero 2016, lo que concuerda con Cuevas-Guevara y Martínez-Guerrero (1979) [10]; Stuardo y Martínez (1975) [11]. La presencia de esta primera fase se puede atribuir principalmente a los cambios ambientales presentes en el sitio de cultivo y a la baja disponibilidad de alimento. Por otra parte, la gametogénesis inicial en hembras y machos se observó de febrero a noviembre 2015, y febrero a octubre 2015, respectivamente. La gametogénesis avanzada se presentó en los meses de marzo y abril 2015 para hembras y para machos en abril 2015; la mayor maduración en junio 2015 para hembras y en septiembre 2015 para machos. Lo anterior concuerda con Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008) [12] en su estudio con *C. corteziensis* en el estado de Sinaloa, donde menciona que la mayor actividad reproductiva es de marzo a noviembre.

CONCLUSIONES

El desove se registró de mayo-octubre 2015 (machos = 93.33% y hembras 86.66%), siendo los meses de julio y octubre 2015 los más representativos; en estos meses se presentaron los gradientes más altos de temperatura, lo que sugiere que este parámetro influyó mayormente en el desove de los organismos.

REFERENCIAS

[1] CONAPESCA, "Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, México". p. 253, 2011.

[2] Y. A. Chávez-Romero, "Caracterización genética del Herpesvirus del ostión asociado con mortalidades de *Crassostrea gigas* en el Noroeste de México". Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. México. p. 58, 2011.

[3] P. J. Cáceres-Martínez, "Efecto de la temperatura en el crecimiento y supervivencia de semilla de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) durante la preengorda en el laboratorio". Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. p. 50, 2005.

[4] Anónimo, "Histological techniques for marine bivalve mollusks". NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC. pp. 25 97, 1983.

[5] B. P. Villanueva-Fonseca, "Efecto de la densidad de siembra y los factores ambientales en el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en la península de Lucernilla, Navolato, Sinaloa". Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. p. 82, 2011.

[6] APHA, "Standard Méthods for the examination of water and wastewater". 19th Edition. American Public Health Association. Washington, D. C. Multiple-Tube Fermentation technique for members of the coliform group. CAP. p. 9221, 1995.

[7] J. D. Strickland y T. R. Parsons. "A practical handbook for the Seawater analysis". Fisheries Research Board of Canada. Ottawa. 310.1972.

[8] S. W. Jeffrey y G. F. Humphrey. "New spectrophotometric equation for determining chlorophyll". a, b, c1 and c2 Biochem. Physiol. Pflanz., 167, 194-204. 1975.

[9] J. Chávez-Villalba, A. Ibarra-Hernández, M. López-Tapia y J. Mazón-Suástegui, "Prospective Culture of the Cortez Oyster *Crassostrea corteziensis* from Northwestern Mexico: Growth, Gametogenic Activity, and Condition Index". Journal of Shellfish Research 27(4). pp. 711-720, 2008.

[10] C. A. Cuevas-Guevara y A. Martínez-Guerrero, "Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, *C. palmula* Carpenter y *C. iridescens* Hanley, de San Blas Nayarit, México (Bivalvia: ostreide)". An. Inst. Cienc. Mar. Limnol. Univ. Nal. Auto. 6. pp. 1-20, 1979.

[11] J. Stuardo y A. Martínez, "Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) de San Blas, Nayarit, México". An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. 2 (1). pp. 89-130, 1975.

[12] C. M. Rodríguez-Jaramillo, Á. Hurtado, E. Romero-Vivas, J. L. Ramírez, M. Manzano and E. Palacios, "Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (HERTLEIN, 1951) during an annual reproductive cycle". Journal of Shellfish Research, Vol. 27, No. 5. pp.1129–1141, 2008.

CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS (PLOMO, COBRE, CADMIO, ZINC Y MERCURIO) EN TEJIDO DE OSTIÓN DEL PACÍFICO *Crassostrea gigas* DIPLOIDES Y TRIPLOIDES CULTIVADO EN EL ESTERO LA PITAHAYA, GUASAVE, SINALOA.

*Hernández-Sepúlveda, J.A., Góngora-Gómez, A.M., Villanueva-Fonseca, B.P., y Domínguez-Orozco, A.L.

Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-SINALOA) / Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101.

*Autor para correspondencia: juanhese@hotmail.com
Área del conocimiento: Biología

RESUMEN
El ostión *Crassostrea gigas,* es cultivado en el mundo por su sabor y textura de la carne, pero por ser un organismo que se alimenta mediante filtración, puede acumular metales pesados haciéndolo peligroso para su consumo. El objetivo fue determinar el efecto de la concentración de Cu, Zn, Cd, Pb y Hg en diploides y triploides de *C. gigas* cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa durante 2013-2014. Mensualmente se registraron los parámetros biométricos y variables ambientales. Las muestras fueron analizadas en CIIEMAD-IPN. El tejido se secó en un horno a 60°C/12 hrs, luego fueron molidos y digeridos con ácido nítrico NHO3 a baño maría a 90°C utilizando el material de referencia (Estándar Reference Material 1566b) para muestras de ostras. Las lecturas se realizaron en un Espectrómetro de Emisión Óptica ICP−Optima 31000. Se concluye que la carga de metales fue afectada mayormente por la ubicación de la granja y no por la ploidía. El orden de acumulación de metales en los ostiones de ambas ploidías encontrado fue Zn>Cu>Cd>Pb>Hg. En el caso del Cu, Cd y Zn, éstos se asocian a posibles aportes de químicos agrícolas, debido su cercanía con tierras de cultivo, así como granjas acuícolas y asentamientos humanos.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*; Ostión japonés; Metales pesados; Acuacultura.

INTRODUCCIÓN
El ostión japonés, *Crassostrea gigas* (Thunberg), representa la especie de ostreidos más cultivada en todo el mundo. De acuerdo a las últimas estimaciones este bivalvo registró una cosecha de 555,994 toneladas en el año 2013, significando 10% de la producción mundial de moluscos [1]. Esta especie fue introducida en México a mediados de los años setenta debido a que presenta características como rápido crecimiento [2], tolerancia a variaciones de temperatura y salinidad [3], buena calidad de su carne [4], forma de la concha y resistencia a enfermedades [5].

Algunos de los efectos más importantes de los metales en los moluscos que habitan los sistemas costeros están relacionados con su capacidad para acumularlos en altas concentraciones (bioacumulación), provocando posteriormente, su incremento en niveles tróficos superiores (biomagnificación). Un ejemplo representativo de dicho efecto lo constituyen los organismos bentónicos de océanos y zonas costeras, principalmente lamelibranquios, ya que siendo estos sésiles y filtradores, se ven afectados por la contaminación de metales tóxicos como Hg, Cd, Cr y Pb, los cuales reducen

drásticamente su potencial reproductivo y de supervivencia ocasionando en algunos casos, su desaparición de las zonas afectadas [6].

El medio acuático puede ser dividido en tres compartimentos principales: agua, sedimentos y organismos vivos. Los elementos metálicos naturalmente presentes en el medio ambiente o introducidos artificialmente por las actividades humanas, se reparten en estos compartimentos en función de diferentes mecanismos de naturaleza química, física o biológica. Los intercambios entre estos espacios están influenciados por las variaciones de los factores ecológicos abióticos, tales como las características físico-químicas del agua y de los sedimentos [7], las variaciones fluviales según las estaciones y fluctuaciones climatológicas, y el sitio de cultivo; o bióticos, como la talla y peso de los organismos, su composición bioquímica, ciclo reproductivo y factores genéticos, dentro de los que destaca la ploidía [8]. De manera particular, las condiciones inherentes del sitio elegido para el cultivo de ostión -como son la vegetación, movimiento del agua, asociaciones biológicas y actividades antropogénicas- y su origen genético, ya sea diploide, triploide o tetraploide para *C. gigas*, juegan un papel importante en la dinámica de captación, acumulación y distribución de los metales pesados que se encuentren disponibles tanto en la columna de agua como en el sustrato.

Los metales entran a un organismo por vía respiratoria, digestiva o cutánea. Una vez incorporados, pueden permanecer en el organismo o ser excretados total o parcialmente dependiendo del elemento, forma química en que se encuentre y la afinidad de los tejidos por cada uno de ellos [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Sistema Lagunar San Ignacio-Navachiste-Macapule. El complejo San Ignacio-Navachiste-Macapule comprende 26,700 ha y presenta una profundidad media de 4 m. El estero La Pitahaya pertenece a la Laguna Macapule, en el municipio de Guasave, Sinaloa. Se encuentra situado en la costa norte del estado de Sinaloa (25°21’ - 25°24’ N, Y 108°30’ - 108°45’ W). Esta laguna está semicerrada por la Isla de Macapule, comunicándose con el Golfo de California mediante dos bocas, Macapule y la Bocanita. La isla cuenta con 22.7 km de longitud, 2.5 km en la parte más ancha y escasos 300 m en su parte más angosta; su costa occidental (hacia el Golfo de California) está compuesta por playas arenosas y dunas de arena. El clima predominante en Guasave es desértico muy caliente, con precipitación media anual de 300 a 400 mm y temperatura media anual de 23 a 25 ºC, con máxima extrema de 45 ºC. La vegetación halófita se presenta en zonas con altos niveles de sales y a lo largo de la costa y partes bajas de los distritos de riego, así como en los esteros y marismas. El clima de la región es de tipo BW (h”) hw, y está incluida en la región hidrológica 10. Los vientos predominantes en verano son del suroeste con un promedio de 2 m s^{-1} y durante el invierno predominan los vientos del noroeste. La evaporación anual media es de 1,534.39 mm y la precipitación media es de 577.9 mm. El período de lluvias corresponde a los meses de julio a octubre, y la temperatura media anual es de 25 ºC y mínimas de 3 ºC. El tipo de marea es mixta semidiurna. La laguna es muy notable por su rica diversidad desde el punto de vista pesquero. El camarón (*Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *Farfantepennaeus californiensis* y *F. brevirostris*) es el principal recurso pesquero en el sistema. Además del camarón, se captura: jaiba (*Callinectes spp.*), almeja pata de mula (*Anadara sp*.), sierra (*Scomberomorus sierra*), berrugata (*Micropogon ectenes*), almeja blanca (*Chione californiensis*), lisa (*Mugil spp.*), botete (*Sphoeroides annulatus*) y pargo (*Lutjanus spp*.) [10].

La laguna tiene una extensión aproximada de 48 km^2, es somera y en su cuerpo interior posee tres islas. La isla de Los Pájaros es de extensión significativa y sirve de anidación para un número importante de aves de diferentes especies. En el extremo noroeste se encuentra la isla Vinorama que la separa de la Laguna Navachiste, lo que origina que el cuerpo lagunar se comunique con Navachiste a través de una estrecha desembocadura; y la Isla Macapule. La costa oriental de la laguna está bordeada por mangles (*Rizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* y *Avicennia germinans*) mientras que en la costa occidental se encuentran principalmente dunas de arena, con pocas zonas de mangle, a excepción de todo lo largo del estero [11].

Obtención y siembra de la semilla

Para la realización del cultivo se utilizaron 7,000 ostrillas diploides y 7,000 ostrillas triploides del ostión del ostión *C. gigas*, previamente certificadas del laboratorio de CIBNOR-La Paz. El tiempo de duración del cultivo fue de Julio 2013 a Julio 2014. La siembra consistió primeramente en aclimatar la semilla a las condiciones propias de temperatura y salinidad del agua presentes en cada uno de los sitios de cultivo. Una vez aclimatadas, se formó una línea de aproximadamente ½ metro y se dividió el total en partes iguales, después, fueron colocadas dentro de bastidores para evitar pérdidas y depredadores. Después del primer mes de cultivo, la población de cada bolsa se desdobló por talla seleccionando la semilla que rebasaba los 30 mm de longitud, para después, transferirlas a costales ostrícolas a una densidad de 200 organismos por costal. Las ostrillas de menor tamaño fueron regresadas a las bolsas mosquitero. Después de dos meses, todas las semillas fueron colocadas dentro de los costales ostrícolas. Durante todo el ciclo de engorde, los costales ostrícolas fueron limpiados mensualmente con la ayuda de cepillos y espátulas, para evitar el lodo y la presencia de algunos organismos que pudieran afectar a los ostiones.

Parámetros biométricos

Mensualmente, se midieron 50 ostiones [12] de las dos diferentes ploidías (triploides y diploides). Las biometrías se realizaron con un vernier digital (Mitutoyo, CD–8" CS) para determinar longitud, largo y ancho del organismos. Se utilizó una balanza granataria (OHAUS, Scout Pro SP 2001) para el peso húmedo total.

Parámetros fisicoquímicos

Mensualmente, se midieron los parámetros: temperatura ambiental (termómetro Brannan 76 mm inmersión de –20 a 100º), temperatura del agua y oxígeno disuelto (oxímetro, YSI, 55/12 FT, Ohio 45387), salinidad (refractómetro de precisión, Atago, S/Mill), pH (potenciómetro, Hanna, HI 8314) y profundidad y transparencia con la ayuda del disco de Sechhi.

Colecta de muestras para metales pesados

Mensualmente, 30 ostiones de cada ploidía fueron colectados y transportados al laboratorio de Acuacultura de IPN-CIIDIR Sinaloa. Una vez en el laboratorio, los ostiones fueron lavados y se realizaron las biometrías correspondientes (longitud, largo y ancho de la concha, y peso total). Después, fueron desconchados y enjuagados con agua destilada para su posterior secado en una estufa a 65°C por 72 h aproximadamente. Transcurrido ese tiempo, los ostiones fueron macerados con la ayuda de un mortero y un pistilo hasta lograr la consistencia de talco, y finalmente, las muestras fueron guardadas en bolsas de plástico hasta su análisis. Todo el material utilizado fue lavado previamente con ácido nítrico (20%) y enjuagado con agua destilada.

Determinación de metales pesados

La determinación de metales pesados se realizó en el Laboratorio de Análisis y Monitoreo Ambiental en CIIEMAD-IPN. Primeramente, las muestras fueron cuarteadas para una mejor homogenización y se pesó 1.5 g (peso seco) de cada muestra en una balanza analítica.

Las muestras se digirieron con 3 ml de NHO_3 al 70% y 0.5 ml 30% H_2O_2 usando un digestor de microondas (Paar Physica Multiwave Six Place) a 300 W durante 5 min, y después a 600 W por 10 min, lo que probó ser suficiente para la digestión. Las digestiones fueron realizadas en recipientes de digestión de 50 ml alineados y equipados con válvulas de seguridad. Después de la digestión, los extractos fueron enfriados a temperatura ambiente durante 20 min, y diluidos a 10 ml con agua de-ionizada. Las digestiones fueron almacenadas a 0-5°C en viales de polietileno etiquetados hasta su análisis. Las muestras de cobre (Cu), cadmio (Cd), plomo (Pb) y zinc (Zn) fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica de flama (Perkin-Elmer, ICP Optima 31000), y el mercurio (Hg) por medio de vapor frío (Perkin-Elmer, A Analyst 100).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables ambientales

En la figura 1 se muestra la temperatura de agua registrada en el sitio de cultivo de ostión japonés, se pude observar una tendencia estacional normal con temperaturas mínimas de 22.2°C en diciembre 2013 y máximas de 31.8°C en julio 2013.

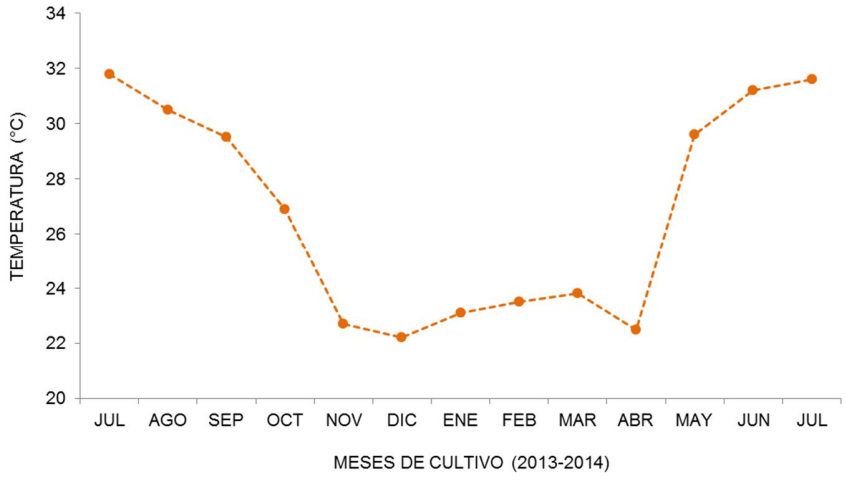


Figura 1. Variabilidad estacional de la temperatura (°C) del agua en el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

Respecto a la variación de salinidad, se obtuvo la mayor (35‰) durante los meses de septiembre 2013 y enero, febrero y abril 2014; la menor (31‰) en de marzo. (Figura 2).

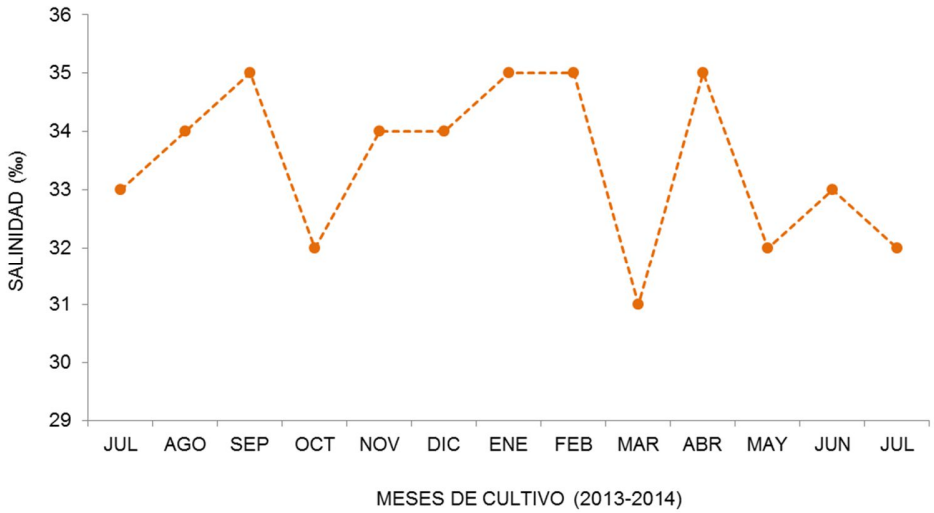


Figura 2. Variabilidad estacional de la salinidad (‰) en el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

El comportamiento del pH durante el ciclo de cultivo osciló entre 6.05 y 8.45 UpH en junio 2014 y agosto 2013 respectivamente (Figura 3).

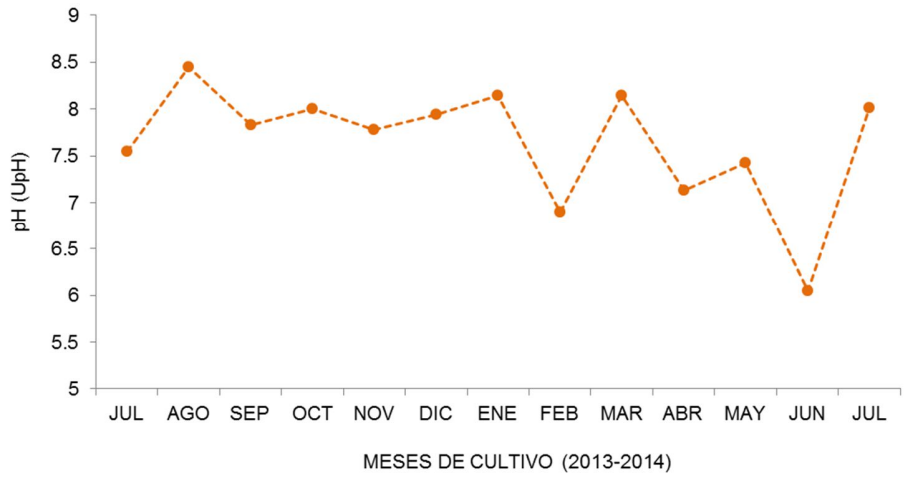


Figura 3. Variabilidad estacional de pH (UpH) en el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

En la figura 4, se observa la variación del oxígeno disuelto durante el cultivo, en el mes de septiembre 2013 se registró la menor concentración que fue de 2.87 mg L^{-1} en Guasave y la mayor de 6.8 mg L^{-1} en febrero 2014.

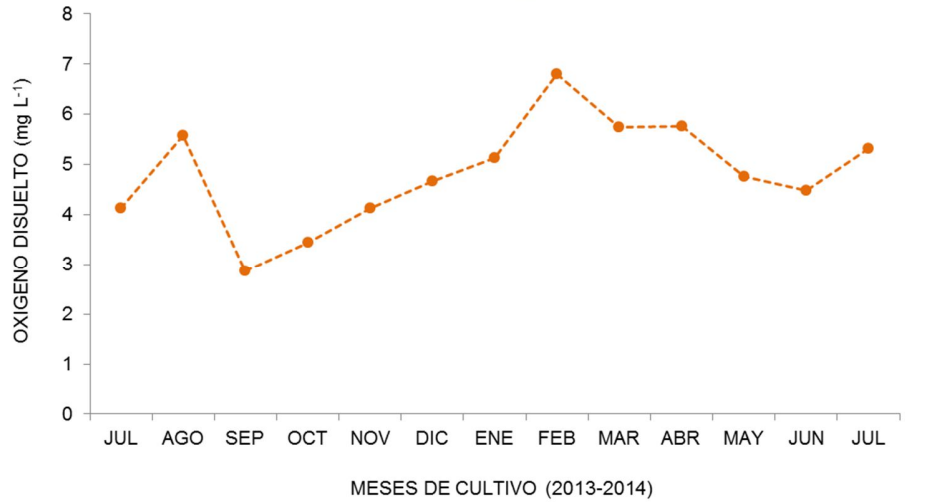


Figura 4. Variabilidad estacional de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) en el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

En cuanto a la profundidad, se observó un comportamiento completamente distinto durante todo el ciclo; el valor más alto (2.6 m) en agosto 2013 y el mínimo (1.0 m) en febrero 2014 (Figura 5).

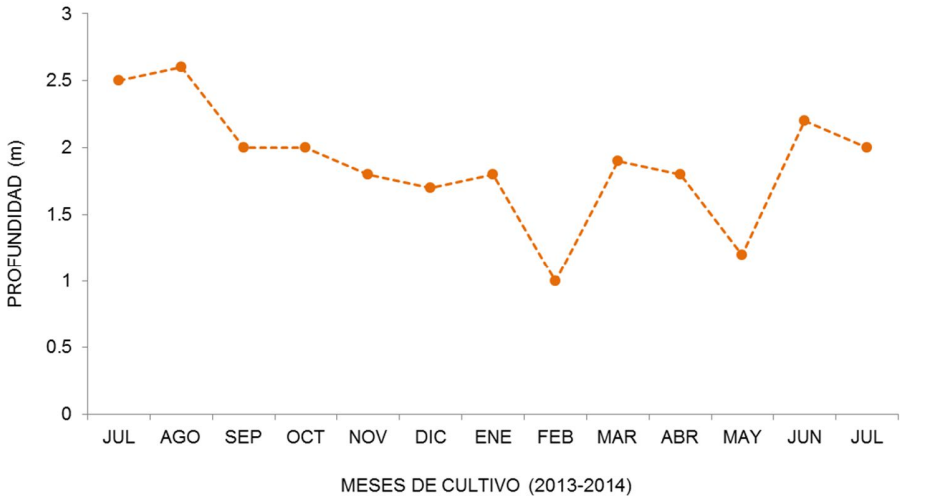


Figura 5. Variabilidad estacional de la profundidad (m) en el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

La transparencia presentó variaciones en el cultivo: el valor mínimo fue de 0.5 m en agosto y octubre 2013 y mayo 2014, mientras que el valor máximo fue de 1.0 m en septiembre 2013 y enero, febrero y junio del 2014, respectivamente (Figura 6).

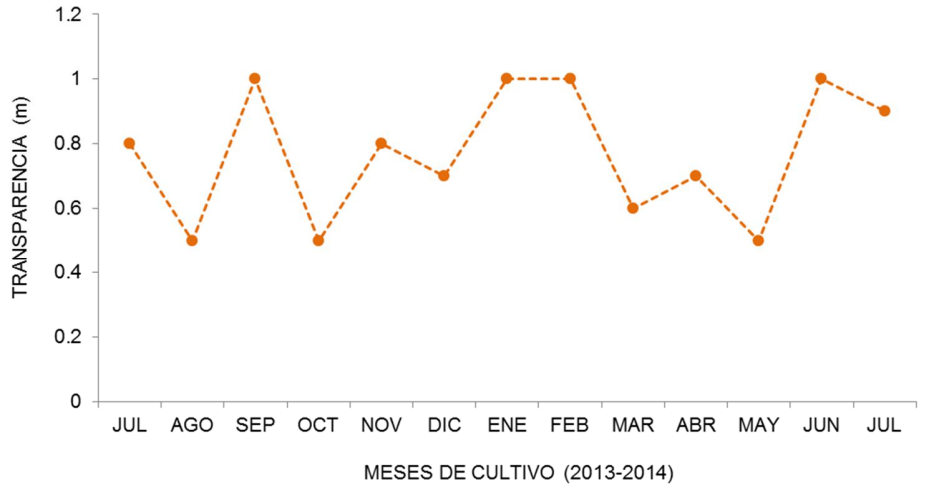


Figura 6. Variabilidad estacional de la transparencia (m) en el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

Variables biométricas

En la figura 7 se muestra el crecimiento en largo de los organismos diploides y triploides los cuales iniciaron con semillas de 11.12 y 13.14 mm respectivamente y concluyeron el cultivo con tallas de: 73.53 mm organismos diploides y 73.69 los organismos triploides.

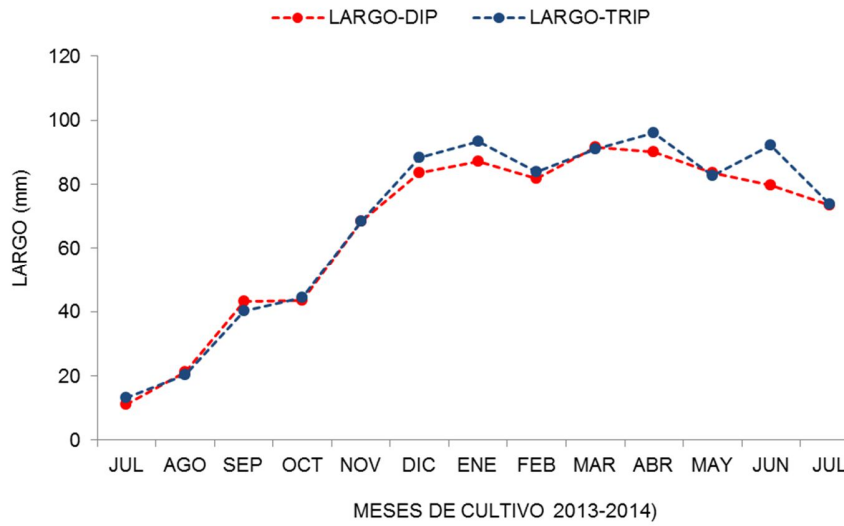


Figura 7. Crecimiento en largo (mm) del ostión japonés *Crassostrea gigas* diploide y triploide cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

En la figura 8 se muestra el crecimiento en peso de los organismos diploides y triploides los cuales iniciaron con semillas de 0.19 y 0.25 g respectivamente y concluyeron el cultivo con pesos de: 46.13 g organismos diploides y 50.29 g los organismos triploides.

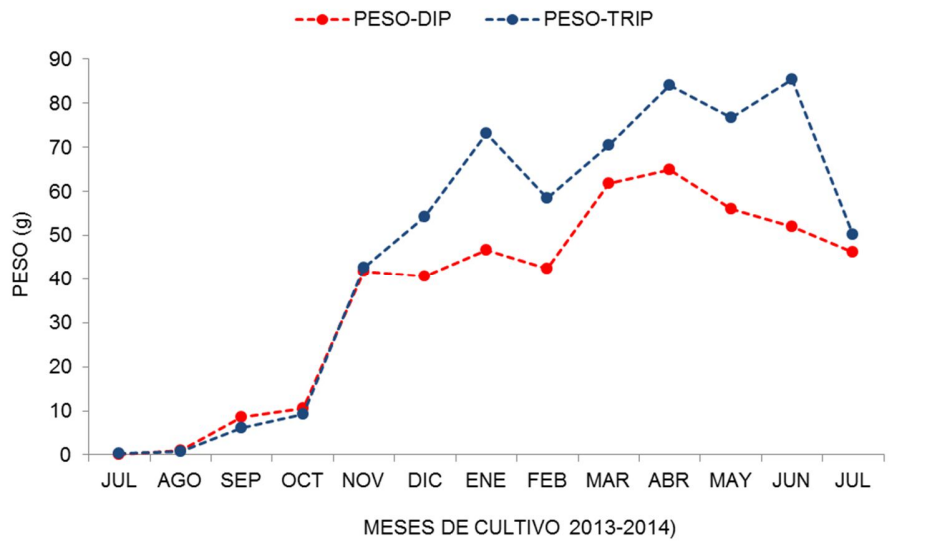


Figura 8. Crecimiento en peso (g) del ostión japonés *Crassostrea gigas* diploide y triploide cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

Metales pesados en ostiones (µg g^{-1} p.s.)

La concentración de Cu durante todo el cultivo fue mayor significativamente para ambas ploidías, con una concentración promedio de 100.59 ± 26.75 µg g^{-1} y 90.84 ± 38.15 µg g^{-1} para ostiones diploides y triploides, respectivamente. (Figura 9).

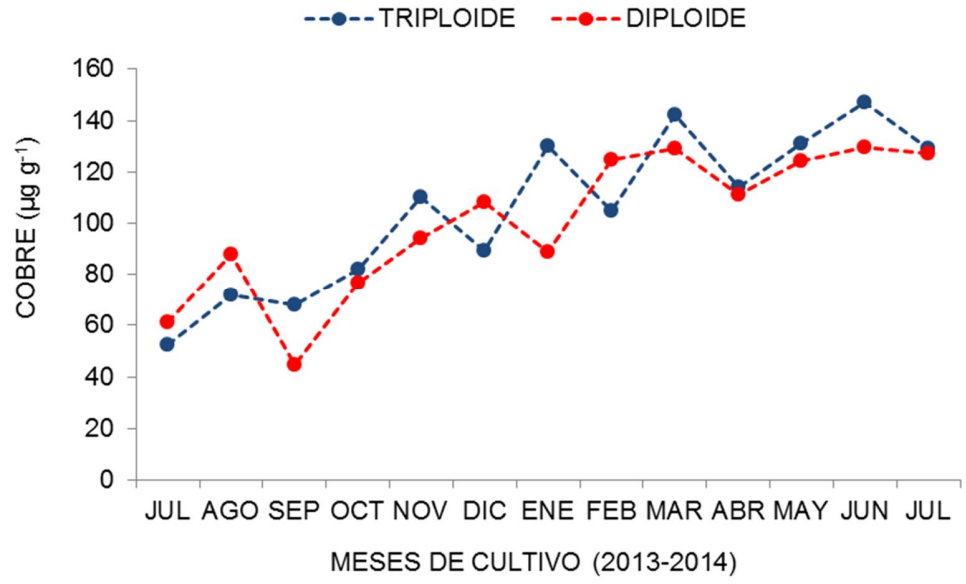


Figura 9. Concentración de Cu (µg g^{-1} p.s.) en tejido de ostión japonés *Crassostrea gigas* diploide y triploide cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

En la figura 10, se observa la concentración de Cd en los ostiones diploides y triploides; los cuales acumularon en promedio 10.51 µg g^{-1} diploides y 8.83 µg g^{-1} triploides, valores que estuvieron por encima de lo establecido por la NOM-1993 (0.5 µ g^{-1}).

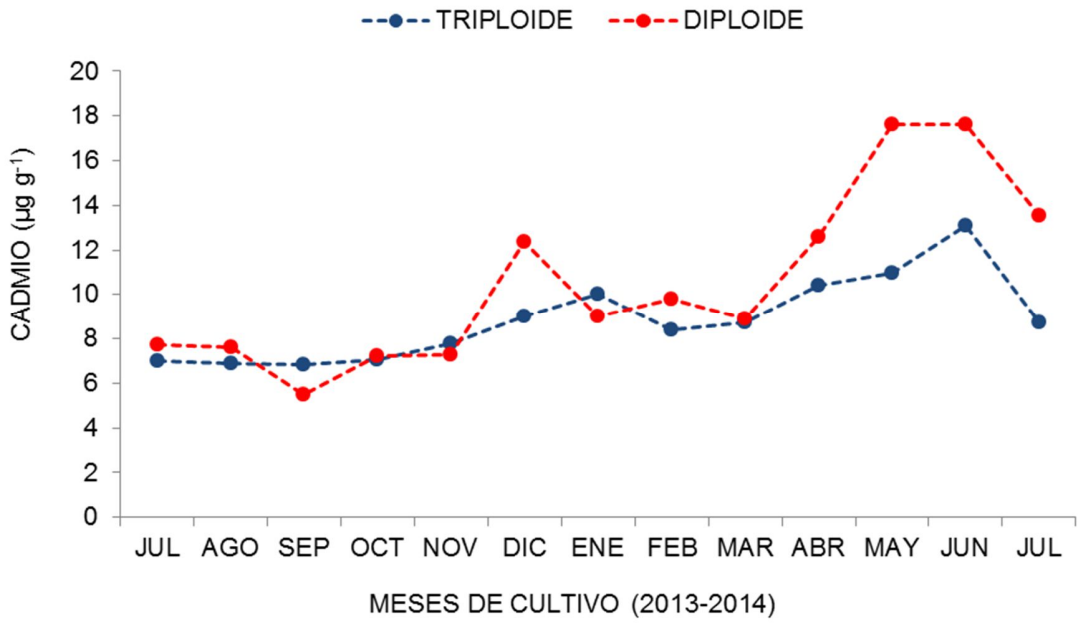


Figura 10. Concentración de cadmio (µg g^{-1} p.s.) en tejido de ostión japonés *Crassostrea gigas* diploide y triploide cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

Respecto al Pb, las concentraciones encontradas fueron similares durante todos los meses de cultivo para ambas ploidías (0.0-5.23 µg g^{-1}, y 0.70-5.28 µ g^{-1}) de ostiones triploides y diploides, respectivamente (Figura 11).

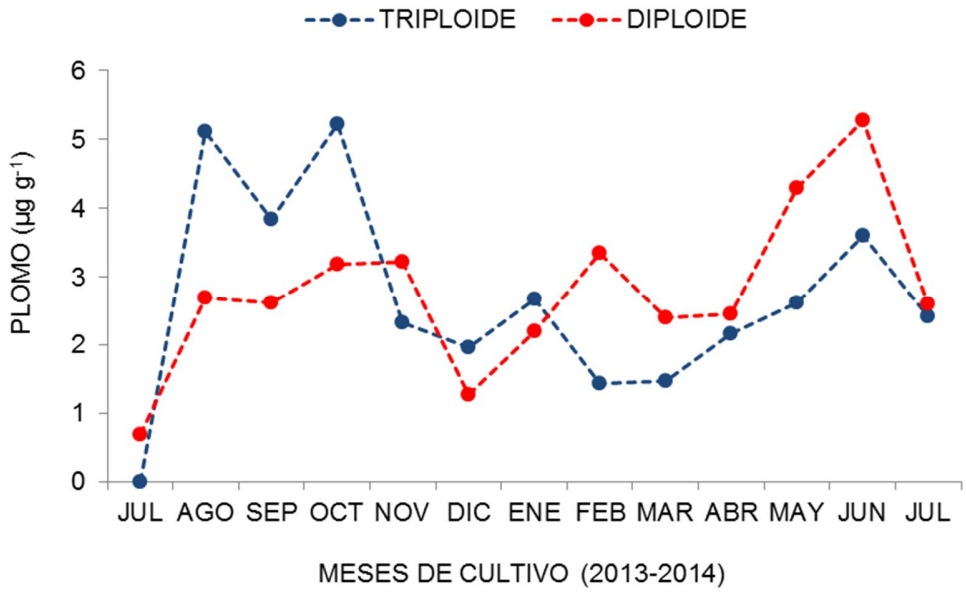


Figura 11. Concentración de plomo (µg g^{-1} p.s.) en tejido de ostión japonés *Crassostrea gigas* diploide y triploide cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

La concentración de Zn presentó variaciones en todo el ciclo: el valor mínimo fue de 192.78 µg g^{-1} en ostiones triploides, mientras que la concentración máxima fue de 403.78 µg g^{-1} para los organismos diploides (Figura 12).

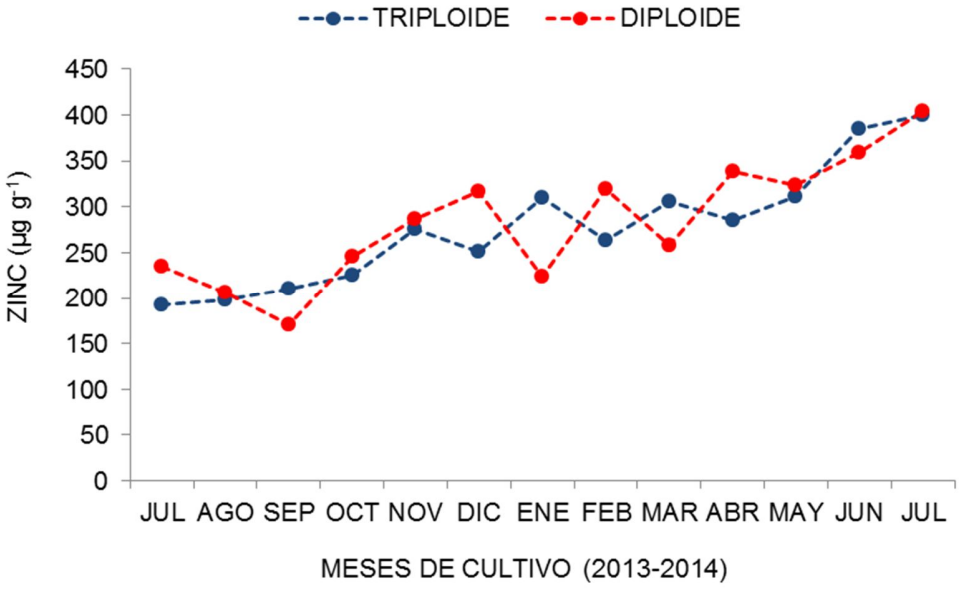


Figura 12. Concentración de Zn (µg g^{-1}, p.s.) en tejido de ostión japonés *Crassostrea gigas* diploide y triploide cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

En el caso de Hg, la concentración menor se encontró en los organismos triploides con un promedio de (0.12 µg g^{-1}) y un promedio mayor (0.18 µg g^{-1}) para los ostiones diploides (Figura 13).

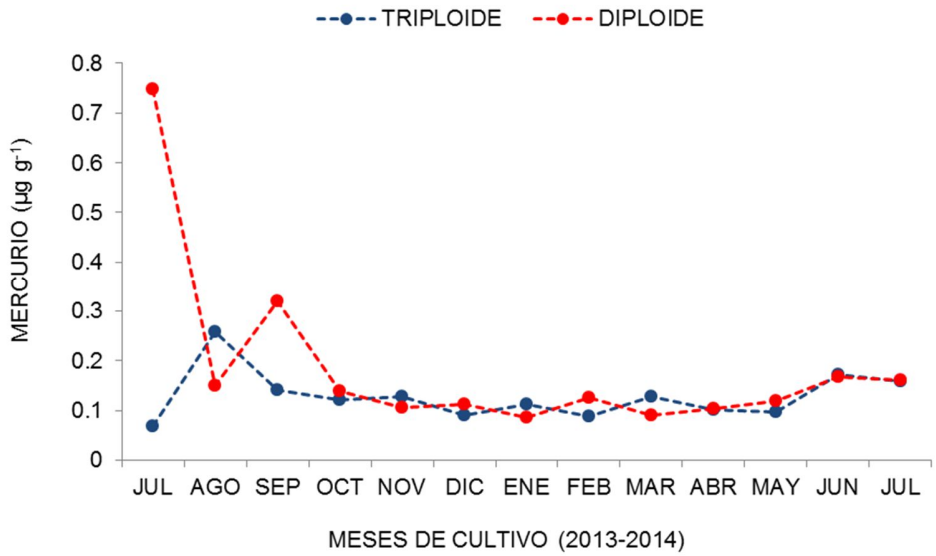


Figura 13. Concentración de Hg (µg g^{-1}) en tejido de ostión japonés *Crassostrea gigas* diploide y triploide cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

Actualmente, no existen estudios previos acerca de las concentraciones de metales en moluscos bivalvos cultivados a lo largo de la costa del estado de Sinaloa que pudieran ser usadas para comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo. La mayoría de la información está basada en la recolecta de organismos silvestres del ambiente [13]. El orden de los metales obtenidos para todos los grupos experimentales mostró que el Zn es el elemento más abundante en el ostión, seguido de Cu, Cd, Pb y Hg [14] mencionan esta misma tendencia en el orden de los metales fue reportada para bivalvos en el suroeste de Taiwan, en la costa central del Pacífico mexicano [15], y en Canadá[16]. Las diferencias en los niveles de metales obtenidas en el presente trabajo comparado con otros estudios pudieran ser parcialmente explicadas por la influencia de factores abióticos y bióticos como la especie, genética, latitud, actividades antropogénicas y ciclo reproductivo, entre otros.

Algunos autores mencionan que cuando se encuentra una asociación consistente entre grupos de metales en bivalvos tales como Cu, Cd y Zn, pudiera indicar un patrón bioquímico particular o establecer una fuente en común [17]. Los metales Cu, Cd y Zn presentaron niveles estables durante el presente estudio, ya que estos se encuentran relacionados mayormente con actividades antropogénicas [18]. Dichos metales son componentes en fertilizantes (AGRINUTRIENTE MICROMAX, AGRINUTRIENTE Cu, AGRINUTRIENTE Zn, AGRINUTRIENTE NUKTAL-A y AGRINUTRIENTE NUKTAL-B) y otros químicos agrícolas tales como pesticidas, carbamatos y fingidicas (Zineb y Cupravit) usados comúnmente en la región para el cultivo de maíz, jitomate y algodón, lo que claramente refleja su contenido en los ostiones [19]. Para el caso de los niveles de Pb encontrados en los ostiones algunos autores mencionan que pudieran ser parcialmente derivados de las granjas acuícolas de la región, además del uso de botes para la pesca artesanal y servicios turísticos en los sistemas lagunares [20]. En el caso del Hg, la fuente más importante son los desperdicios municipales y la composición mineral de las rocas a lo largo del río, el

cual es arrastrado a los esteros. Aunque los niveles detectados de Hg en los ostiones fueron bajos, pudiera llegar a ser tóxico por la cantidad de bivalvos consumidos [21] [22].

CONCLUSIONES

- Las condiciones ambientales específicas de los sitios de cultivo influyeron en la tasa de crecimiento y la supervivencia en mayor medida que la ploidía del ostión.
- Los niveles promedio de Cu, Cd y Pb en ostiones cultivados, sobrepasaron los límites permisibles por normatividades nacionales y extranjeras.
- Se deben realizar más estudios acerca de la carga de metales pesados en ostiones de las granjas ostrícolas experimentales, y establecer estrategias de depuración antes de ser consumidos.
- Es importante consumir ostiones de manera moderada y en lugares seguros, ya que una intoxicación por consumo de estos, puede ocasionar graves problemas de salud en adultos y niños principalmente.

REFERENCIAS

[1] FAO, "Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)". Available online at: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassotreagigas/en. (downloaded July 24, 2015), 2015.

[2] N. Taris; F. M. Batista and P. Broudy, "Evidence of response to unintentional selection for faster development and inbreeding depression in *Crassostrea gigas* larvae". Aquaculture 272:69-79. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.010, (2007).

[3] C. Flores-Vergara; B. Cordero-Esquivel, A. N. Cerón-Ortiz and B. O. Arredondo-Vega, "Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat". Aquac. Res. 35:1131-1140. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01136, 2004.

[4] C. Langdon; F. Evans, D. Jacobson and M. Blouin, "Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas*, Thunberg, improved after one generation of selection". Aquaculture 220:227-244. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00621-X, 2003.

[5] L. C. Villanueva-Fonseca; and C. M. Escobedo-Bonilla, "Prevalencia del protozoario Perkinsus sp.en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México". Latin American Journal of Aquatic Research. 41(5): 996-1002. DOI: 103856/vol41-issue5-fulltext-19, 2013.

[6] A. V. Botello; G. Ponce-Vélez, A. Toledo, G. Díaz-González and S. Villanueva, (1996). "Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México", p 25-44. *In* A.V. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J A. Benitez, D. Zárate-Lomelí (Eds). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico, y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. *EPOMEX* Serie científica, 5. 666, 1996.

[7] J. Frazier; S. George and J. Overnell, "Characterization of two molecular weight classes of Cd binding proteins the *Mytilus edulis"*. Comp. Biochem. Physiol, 80: 257-262, 1985.

[8] B. Berthet, B; L.C. Amiard; C. Amiard-Triquet; M. Martoja and A.Y. Jeanet, "Bioaccumulation, toxicity and physic-chemical speciation of silver in bivalve mollucs: Ecotoxicological and health consequences". Sciences and Total Environment 125: 97-122, doi:10.1016/0048-9697(92)90385-6, 1992.

[9] E. J. Skoch and LaCognata, "Recommended methods for the digestion and analysis of Heavy Metals in tissues Marine Mammals" Research Lab Cleveland. Oh, (1998).

[10] Instituto Nacional de la Pesca, "Estado de Salud de la Acuacultura" XXI. 1-29, 2000.
[11] D. Escobedo-Urías; M. T. Hernández and M. N. Herrera-Moreno, "Calidad bacteriológica del sistema lagunar de San Ignacio-Navachiste, Sinaloa". Ciencia y Mar. Vol. III. Num. 9-17, 1999.
[12] P. S. Galtsoff, "The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin". U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Ser. Fish. Bull., 64-480, 1964.
[13] F. Páez-Osuna and L. Tron-Mayen, "Concentration and distribution of Heavy Metals in tissues of wild and farmed shrimp *Penaeus vannamei* from the Northwest coast of México". Environment International, vol. 22, No. 4, 443-450, 1996.
[14] Ch. Y. Chen and M. H. Chen, Investigation of Zn, Cu, Cd and Hg Concentrations in the oyster of Chi-ku, Tai-shi and Tapeng Bay, Southwestern Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis 11: 32-38, 2003.
[15] F. Páez-Osuna, F., M. G. Frías-Espiricueta and J. I. Osuna-López, "Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster, *Crassostrea iridescens"*. Marine Environmental Research 40: 19-31, doi:10.1016/0141-1136(94)00004-9, 1995.
[16] J. R. Widmeyer and L. J. Bendell-Young, "Heavy metal levels in suspended sediments, *Crassostrea gigas*, and the risk to humans". Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 55: 442-450. doi:10.1007/s00244-007-9120-3, 2008.
[17] B. F. Lasseter; R. P. Burke; J. Ruger and T Davison, "Patterns of trace metals appearing in shells of *Crassostrea virginica"*. Journal of Shellfish Research 35: 71-81. doi:10.2983/035.035.0109, 2016.
[18] M. E. Jara-Marini; J. N. Tapia-Alcazar, J. A. Dumer-Gutiérrez, L. García-Rico, J. García-Hernández and F. Páez-Osuna, "Comparative bioaccumulation of trace metals using six filter feeder organisms in a coastal lagoon ecosystem of the central-east Gulf of California". Environmental Monitoring Assessment 185: 1071-1085. doi:10.1007/s10661-012-2615-z, 2013.
[19] F. Páez-Osuna; A. García; F. Flores-Verdugo L. P. Lyle-Fritch; R. Alonso-Rodríguez; A. Roque and A. C. Ruíz-Fernández, "Biochemical composition of the oysters *Crassostrea iridescens* Hanley and *Crassostrea corteziensis* Hertlein in the Northwest coast of Mexico: seasonal changes". Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 170: 1-9. doi:10.1016/0022-0981(93)90125-8, 1993.
[20] S. N.Luoma and P. Rainbow, "Why is metal bioaccumulation so variable Biodynamics as a unifying concept". Environmental Science and Technology 39: 1921-1931. doi:10.1021/es048947e, 2005.
[21] NOM. "Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Pescados Frescos-Refrigerados y Congelados, NOM-027-SSA1-1993". Diario Oficial de la Federación, México, D.F. 1993.
[22] FDA. "Federal Drug Administration. National Shellfish Sanitation Program. Guide for the Control of Molluscan Shellfish". U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Interstate Shellfish Sanitation Conference USA, 427, 2003.

DEFINICIÓN DE ECOREGIONES PARA LA ESTIMACIÓN DE EMISIONES DE CARBONO BASADAS EN LOS TIPOS DE VEGETACIÓN DEL ESTADO DE JALISCO.

[1]Gottfried-Burguett, E. y [1]Flores-Garnica, J.G.

1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

*Autor para correspondencia: egottfried27@gmail.com

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

Los incendios forestales son un factor relacionado al calentamiento global, debido a las emisiones de carbono que estos producen y las alteraciones que provocan en la composición y función del ecosistema, como es la degradación del suelo, la deforestación, y la proclividad al cambio de uso de suelo. No obstante, la magnitud de estos cambios depende de varios factores que condicionan la ocurrencia de incendios y su comportamiento, como: la carga de combustible disponible en el ambiente, el tipo de vegetación, nivel de humedad, condiciones climatológicas, entre otros. Debido a esto es necesario desarrollar estrategias que permitan evaluar la cantidad de emisiones de carbono que, potencialmente, pueden liberarse en un incendio forestal. Para esto se cuenta con programas específicos, como lo es el, Fuel Characteristic Classification System (FCCS), desarrollado en Estados Unidos. Con el cual se puede estimar el potencial de emisiones de carbono de acuerdo a los combustibles presentes en el ambiente. (árboles, arbustos, hierbas, leños, hojarasca, árboles muertos en pie, etc.). Sin embargo, para su uso se requiere conocer: a) la ecorregión en la que se ubica el área de estudio; y b) la cama de combustibles que representa el tipo de vegetación. No obstante, las ecorregiones que se usan en este sistema no se tienen clasificadas para México, por lo que fue necesario establecer una correspondencia con los tipos de vegetación. Para ejemplificar este proceso, se trabajó con el estado de Jalisco, del cual se identificaron 34 tipos distintos de vegetación; 9 de bosques, 13 de selvas, 4 en matorrales y 8, en otras áreas forestales. Junto con los tipos de vegetación para definir las ecorregiones que corresponden a Jalisco se tomaron en cuenta también condiciones climatológicas, geológicas y edafológicas. De esta forma, se determinaron 20 ecorregiones para el estado de Jalisco, con las cuales se puede iniciar el proceso de estimación de emisiones de carbono utilizando el Fuel Characteristic Classification System. Sin embargo, como se mencionó, el siguiente paso será definir las camas de combustibles correspondientes. Lo cual se llevará a cabo en futuros estudios con base a información del Inventario Nacional Forestal y de Suelos.

Palabras clave: Incendio forestal; Calentamiento Global; Fuel CharacteristicClassificationSystem.

REFERENCIAS

[1] Challenger, A., y J. Soberón. 2008. Los ecosistemas terrestres, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 87-108

[2] Ottmar, R.D., Sandberg, D.V., Riccardi, C.L. y Prichard, S. J. 2007. An overview of the Fuel Characteristic Classification System Quantifying, classifying, and creating fuelbeds for resource planning. Canadian Journal of ForestResearch. 37: 2383-2393.

[3] Yokelson R. J., S. P. Urbanski, E. L. Atlas, D. W. Toohey, E. C. Alvarado, J. D. Crounse, P. O. Wennberg, M. E. Fisher, C. E. Wold, T. L. Campos, K.

DESARROLLO INTRACAPSULAR DEL CARACOL CHINO ROSADO *Hexaplex erythrostoma* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

*Góngora-Gómez, A.M., Villanueva-Fonseca, L.C., Domínguez-Orozco, A.L., y García-Ulloa-Gómez, M.

Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-SINALOA) / Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101.

*Autor para correspondencia: gogam69@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN

El caracol chino rosado *Hexaplex erythrostoma* es una de las siete especies de gasterópodos del género *Hexaplex* distribuidos ampliamente desde el Golfo de California hasta Perú, su pesquería representa una fuente laboral y alimenticia para los habitantes de la región del Pacífico, la captura de esta especie ha sido tan alta que en los últimos años ha venido decreciendo principalmente en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa, lo que ha llevado a una disminución de la especie solicitando reducir la captura en estas entidades, esta disminución es preocupante no solo por el bienestar de los pescadores, sino por el impacto que puede ocasionar al ecosistema bentónico submareal. El objetivo del presente estudio fue conocer el desarrollo intracapsular del caracol chino rosado *Hexaplex erythrostoma* en condiciones de laboratorio. Ocho progenitores fueron recolectados en la Bahía de Jitzámuri, Ahome, Sinaloa y posteriormente trasladados al laboratorio donde fueron colocados en un acuario de 80L con agua de mar. Se observaron las etapas del desarrollo embrionario como: huevo fertilizado, inicio del movimiento de la larva trocófora, gástrula, larva preveliger y véliger. Los resultados de esta investigación aportaran información necesaria para la biología de esta especie de importancia pesquera.

Palabras clave: *Hexaplex erythrostoma*; Reproducción; Desarrollo embrionario; Laboratorio.

INTRODUCCIÓN

El caracol “Murex negro”, *M. nigritus* (Philippi 1845) es una de las cuatro especies de gasterópodos del género *Muricanthus* distribuidos ampliamente desde el Golfo de California hasta Perú [1]. Si bien la importancia comercial de esta especie es menor a aquella atribuida al callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby 1835), su pesquería representa una fuente laboral y alimenticia para los habitantes de la región del Pacífico. En México, se extrae de manera intensiva en las costas del Golfo de California [2;3]. La captura de esta especie ha sido tan alta que en los últimos años ha venido decreciendo principalmente en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa, lo que ha llevado a una disminución de la especie solicitando reducir la captura en estas entidades [3]. Con la demanda del mercado asiático por su carne y opérculo, el caracol murex negro *M. nigritus*, fue colectado en 1993 en grandes cantidades en Puerto Peñasco, desembarcando 600 toneladas en un verano, mucho más de lo que se había registrado en cualquier otro año para la producción de caracol en todo el estado de Sonora. Para 1999, la producción había caído aproximadamente a 80 toneladas, los buzos se

aventuraban a aguas más profundas y nuevas zonas de pesca, y la cantidad de especies colectadas durante el verano se había diversificado para lidiar con la baja producción del caracol [4]. La disminución del caracol negro es preocupante no solo por el bienestar de los pescadores, sino también por el impacto que puede ocasionar a todo el ecosistema bentónico submareal, alimentándose de numerosos bivalvos. Además, la concha de estos caracoles sirven como un importante si no es que crucial hábitat para numerosas especies de moluscos y artrópodos. Esencialmente, las agregaciones reproductivas de caracol actúan como arrecifes temporales, proveyendo substrato, refugio y alimento en una región donde los substratos rocosos no son abundantes [5]. La alta demanda del recurso y factores alternos, como es el desarrollo de la actividad turística en la región han propiciado que estos organismos disminuyan en abundancia [2;3]. Es debido a la sobreexplotación a la cual está siendo sometida esta especie, que se consideró necesario realizar este trabajo, el cual, con sus resultados auxiliará en el manejo y recuperación de la pesquería de este molusco, cuya explotación controlada podría ser interesante en términos pesquero-comerciales para los países en donde este ejemplar habita. El objetivo de la presente investigación fue Describir la reproducción y el desarrollo embrionario del caracol *M. nigritus,* por un periodo de doce meses en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento del agua de mar

El agua de mar fue tratada con un filtro de arena, filtros de cartucho de polipropileno y celulosa con una capacidad de retención de 25, 15 y 5µm. Finalmente el agua pasó por una batería de luz ultravioleta [6;7].

Recolecta y establecimiento de los progenitores

Siete progenitores fueron colectados mediante la técnica de marisqueo en diferentes puntos de Isla Los Redos, Navolato, Sinaloa, México en marea baja, sobre arena fangosa y algas macroscópicas *Caulerpa sertularioides* y *Sargassum sinicola*. De los siete progenitores recolectados, cinco fueron hembras y dos machos, éstos fueron colocados en contenedores de plástico con agua de mar a 28ºC y salinidad de 35‰. Posteriormente, fueron trasladados al laboratorio teniendo cuidado que durante el traslado la temperatura no rebasara los 32ºC [7].

Sistema de mantenimiento de los progenitores

Los progenitores fueron recolocados en un acuario de 150L con agua de mar previamente filtrada y esterilizada con luz U.V, velocidad de flujo de 200 ml/min con una tasa de recambio de volumen total de 5h y filtro biológico formado de arena, graba, tul, lámina de fibra de vidrio y tubos de PVC respectivamente. Se aplicó aireación y calefacción al agua para conservar la temperatura a 28ºC. Se tomaron lecturas periódicas de salinidad, pH, temperatura y oxígeno disuelto. Los progenitores fueron alimentados con organismos bivalvos de las especies: almeja china *Chione californiensis,* almeja marinera *Chione subrugosa,* mejillón *Mytella strigata*, almeja catarina *Argopecten circularis,* pata de mula *Anadara tuberculosa*, almeja blanca *Dosinia ponderosa*, Venus rayada *Chione subrugosa*, almeja de lodo *Protothaca asperrima*, choro *Donax radiata* y mejillón chino *Cardita affinis* [2;7].

Obtención, limpieza y observación de las masas ovígeras

Las masas ovígeras obtenidas fueron recolectadas directamente de los acuarios de los organismos progenitores. Una vez que la hembra terminó de ovopositar, con la ayuda de un bisturí se quitaron las masas de las paredes de los acuarios. Con la finalidad de eliminar protozoarios y otras especies

indeseables se procedió a pasar las capsulas por cuatro contenedores, el primero de ellos con una solución de cloro comercial (NaClO) y agua de mar filtrada al 0.2% entre 30 y 40s. Inmediatamente después se colocaron en otros tres recipientes conteniendo agua de mar filtrada para eliminar la solución de cloro [8]. Las masas ovígeras fueron observadas bajo un microscopio óptico de campo oscuro para verificar que los huevos fueran fértiles, viables, y que se encontraran en el mismo estadio de desarrollo, es decir con la membrana de fertilización presente.

Incubación

La masa de huevos fue despegada y separada en 106 cápsulas para contar el número de embriones presentes en cada cápsula y en toda la masa ovígera. Cada fracción se colocó en tres recipientes de plástico de 10L con agua de mar filtrada a una salinidad 36‰ y temperatura de 30ºC, esto para llevar a cabo el desarrollo embrionario y posteriormente la eclosión. Se tomaron lecturas diarias de salinidad, pH, temperatura y oxígeno disuelto. Con la finalidad de evitar contaminación del medio externo, los acuarios se cubrieron con malla y con un sistema de aireación en el agua [8].

RESULTADOS

Las conchas de los gasterópodos murícidos carecen de dimorfismo sexual, por lo que para la determinación del sexo, es necesario observar las partes blandas buscando la presencia o ausencia de pene. Las hembras depositaron en las paredes del acuario un total de 24 masas ovígeras (mayo del 2010 a abril del 2011), formando una gran freza. Al inicio del experimento, durante el mes de mayo, se recolectaron 2 masas ovígeras, posteriormente se observó un aumento de éstas, durante los meses de junio y julio, observándose una disminución drástica durante el mes de agosto, fue durante los meses de septiembre a febrero que no se obtuvo ninguna masa ovígera. Es durante el mes de marzo en que nuevamente se observa la presencia de masas de huevos, hasta la finalización del experimento en el mes de abril. El tiempo registrado de eclosión, a una temperatura de 30ºC, fue de 9 días. El número total de embriones obtenidos fue estimado mensualmente con base en la relación de la altura y ancho de 40 capsulas, por la suma de estas en una masa ovígera. El número máximo de capsulas en una masa ovígera fue de 130. La altura y ancho estimados de 15.05 y 4.93 cm respectivamente, el número promedio de embriones encontrados por capsula fue de 1 714, obteniéndose un total de 192 873 cigotos en toda la masa de huevos. Los resultados promedio de los parámetros físico-químicos fueron los siguientes: salinidad 36.5 $\pm$ 0.5 ‰, pH 7.4 $\pm$ 0.5, temperatura 30 $\pm$ 0.2ºC y oxígeno disuelto 6.9±0.7mg/l.

DISCUSIÓN

El número de embriones por cápsula para *H. nigritus* en este estudio, se puede considerar que coincide con lo registrado para otros muricidos. *M. florifer* presentó un número total de embriones por cápsula de 5 cigotos [9]; mientras que *C. concholepas* presentó 2 600-13 187 embriones por cápsula [10]. Fecundidades altas en animales van acompañadas de mortalidades larvales altas [11]. Una hembra, en promedio, produce tal cantidad de huevos durante su ciclo de vida que asegura que al menos una hembra de su descendencia sobreviva y se reproduzca, como Spight (1976) [11] dedujo de estudios sobre fecundidad, estructura de tallas y conteo de juveniles de *Thais lamellosa*. La temperatura tiene un impacto significativo en el desarrollo larvario, este hecho es claro en los estudios realizados con otras familias de murícidos: como lo ocurrido para *P. pansa* a una temperatura del agua de 21-23ºC, el desarrollo tomó 36-65 días hasta la eclosión, el periodo de desarrollo de *T. bufo* para la temperatura de 24ºC hasta la fase de eclosión tarda aproximadamente 10-11 días, mientras para *T. haemastoma* a esa misma temperatura la eclosión resultó ser de 15 días. En el presente trabajo el tiempo registrado de

eclosión para *H. nigritus* a una temperatura de 30ºC resultó ser de 9 días, el cual es rápido, si es comparado con otras familias de muricidos. La temperatura en nuestro estudio (30ºC) fue similar a la temperatura del agua en el campo de junio a julio, periodo en el que se efectúa los máximos desoves en el medio natural [2]. Gallardo (1994) [10] encontró que en *Concholepas concholepas*, salinidades bajas retardan el desarrollo intracapsular. En este trabajo, la salinidad no afectó el desarrollo intracapsular de *H. nigritus*. Se recomienda para futuros experimentos sobre desarrollo intracapsular, poner más atención en mantener estables las condiciones de temperatura y salinidad de los sistemas de cultivo.

CONCLUSIONES

Las condiciones empleadas, así como el sistema de mantenimiento de los progenitores, resultaron ser excelentes para la obtención de las masas ovígeras en el laboratorio, así como la supervivencia y reproducción de los progenitores bajo condiciones controladas. Los resultados de esta investigación aportaron información necesaria para la biología de esta especie de reciente importancia pesquera.

REFERENCIAS

[1] FAO, 2007. The status of world fisheries and aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Electronic Publshing Policy and Support Branch, Communication Division, Rome, Italy. 180 p.

[2] Cudney, B. R., R. Prescott, & O. H. Huerta. 2008. The black murex snail, *Hexaplex nigritus* (Mollusca, Muricidae), in the Gulf of California, México: I. Reproductive ecology and breeding aggregations. Bull. Mar. Sci. 83:285–298.

[3] Cudney,B.R., Rowell, K. 2008.Establishing a baseline for management of the rock scallop Spondylus calcifer (Carpenter, 1857): Growth and reproduction in the upper Gulf of California, México. J. Shellfish Res. 27:625-632.

[4] Camacho, S. F. Y. 2009. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario del caracol burro *Hexaplex* (*Muricanthus*) *nigritus* (Philippi, 1845) en la Ensenada La Palmita, Navolato, Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Universidad de Occidente. 1-47 pp.

[5] Góngora, G. A. M., 2008. Desarrollo embrionario del caracol burro negro *Muricanthus nigritus* (Muricidae) colectado en la isla Macapule, Guasave, Sinaloa, 1er Encuentro Internacional Islas del Golfo de California. 89 p.

[6]Rodríguez, G. A. 1995. Eclosión del caracol de leche, *Strombus costatus* basado sobre el desarrollo embrionario. Rev. del Centro de Graduados e Invest. I.T.M 23: 1-18.

[7]Góngora, G. A. 1999. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario del caracol marino *Strombus pugilis* (L). Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 38 p.

[8]Aldana, A. D. & V. Patiño. 1998. Overview of diets used in larviculture of three Caribbean conchs: queen conch *Strombus gigas*, milk conch *Strombus costatus* and fighting conch *Strombus pugilis*. Aquaculture 167:163-178.

[9]D'Asaro, C. N. 1970. Egg capsules of prosobranch mollusks from south Florida and the Bahamas and notes on spawning in the laboratory. Bull. Mar. Sci. 20:414-440.

[10] Gallardo, C. S. 1994. Efecto de diferentes salinidades en la sobrevivencia embrionaria y desarrollo intracapsular del gastrópodo *Concholepas concholepas* (Brugiere, 1789) bajo condiciones de laboratorio. Rev. Biol. Mar. 29: 263-279.

[11] Spight, T. M. 1976. Ecology of hatching size for marine snails. Ecologia, Berlin. 24: 283-294.

EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Dodonaea viscosa* (SAPINDACEAE) SOBRE LA CANTIDAD DE HEMOCITOS DE *Spodoptera exigua* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

[1*]Ramírez-Zamora, J., [2]Flores-Macías, A., [3]Salinas-Sánchez, D.O., y [4]Figueroa-Brito, R.

1. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Estudiante de la Maestría en Ciencias Agropecuarias. Calzada del Hueso 1100, Coyoacán, Ciudad de México 04960.
2. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada del Hueso 1100, Coyoacán, Ciudad de México 04960.
3. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación. Departamento de Manejo de Recursos Naturales y Educación Ambiental. Av. Universidad 1001. Cuernavaca, Morelos, México 62209.
4. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de Interacciones Planta e Insecto. Laboratorio de Entomología. Carretera Yautepec-Jojutla Km. 6, AP 24, Yautepec, Morelos, México 62731.

*Autor para correspondencia: rz85juan@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN
Algunos extractos botánicos afectan el sistema inmune celular de los insectos, interfiriendo con la función normal de los hemocitos, provocando que estos sean más susceptibles a los patógenos. Esta actividad biológica podría ser empleada como una estrategia alternativa y sostenible para el control de insectos plaga. En este trabajo se evaluó la actividad de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa* sobre la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de *S. exigua*. Los extractos, a diferentes concentraciones, se incorporaron a la dieta artificial con que se alimentaron las larvas. Las muestras de hemolinfa se recogieron a los 12 días de montado el experimento. Se observó una disminución en el número de hemocitos por mililitro en todos los tratamientos con *D. viscosa*. Sin embargo, únicamente el extracto acetónico a 1000 ppm y los metanólicos a 1000 y 4000 ppm resultaron diferentes significativamente a los testigos negativos (agua y Tween® 20). El extracto metanólico a 4000 ppm fue el tratamiento en el que se encontró la menor cantidad de hemocitos por mililitro (5.56 ± 0.27 X $10^6 \cdot ml^{-1}$), mostrando porcentajes de disminución del 46.2 y 37.6 % con relación a los testigos agua y Tween® 20, respectivamente.

Palabras clave: Hemocitos; *Dodonaea viscosa*; *Spodoptera exigua*.

INTRODUCCIÓN

Las plagas de los cultivos son una de las principales causas de pérdidas de cosechas y, por ello, de pérdidas económicas en la agricultura mundial [1], [2]. Los insectos plaga destruyen entre un 18 y 26% de la producción anual de cultivos en todo el mundo [1].

El gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hübner) es una plaga de distribución mundial [3], [4]; en México se encuentra en gran parte del país. Afecta, aproximadamente, a 130 cultivos hortícolas de 30 familias

diferentes, entre ellos el algodón, frijol, maíz, sorgo, soya, papa, chile y jitomate [5]. Es en la etapa larval cuando causa daños a sus hospederos. Tradicionalmente, ha sido combatido con plaguicidas sintéticos [6].

Este tipo de químicos agrícolas sintéticos han terminado por ocasionar serios problemas ambientales y de salud pública, lo que ha llevado a reconsiderar el paradigma actual de su empleo, orientándolo hacia la búsqueda de una producción menos nociva, basada en el uso de estrategias alternativas sostenibles, como la aplicación de productos botánicos y bio-agentes de control biológico, fundamentadas en aspectos como baja toxicidad, alta diversidad estructural, baja persistencia y provenir de fuentes renovables [7].

Recientemente, se sabe que algunos insecticidas botánicos en niveles sub-letales son suficientes para interferir con la inmunidad celular de insectos. Específicamente, los extractos de plantas causan alteraciones ultra-estructurales en los hemocitos, células especializadas que reconocen, controlan y eliminan patógenos, lo que dificulta que realicen sus funciones normales. Así, sí el insecto se encuentra inmunodeficiente, la acción de los patógenos será más eficaz [8]–[12]. Esta actividad biológica podría ser empleada como una estrategia sostenible para el control de insectos plaga y, ser una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos.

La planta *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (Sapindaceae) ha sido de interés para los investigadores, ya que contiene metabolitos secundarios del tipo flavonoide y terpenoide [13], [14], mostrando actividad tóxica sobre insectos plaga del género *Spodoptera* [15], [16], por lo que en este trabajo se evaluó la actividad de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa* sobre la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de *S. exigua*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Larvas de Spodoptera exigua

Para establecer la cría de *S. exigua* se recolectaron ejemplares, en mayo del 2016, en cultivos de espinaca del municipio de Los Reyes, Puebla; localizado en las coordenadas 18°57’ N y 97°48’ O, con una altitud de 2100 msnm [17]. Los insectos se conservaron por seis generaciones, en el Laboratorio de Entomología del Departamento de Interacción Planta Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Las larvas fueron alimentadas con una dieta artificial [18] y mantenidas dentro de una cámara incubadora a 27 ± 1 °C, humedad relativa de 60-70% y un fotoperíodo de 12-12 h luz-obscuridad.

Extractos de Dodonaea viscosa

El material vegetal se colectó en el mes de septiembre del 2016 en Barranca Honda, Tlaltizapán, Morelos, ubicado en las coordenadas 18°49’04” N y 99°06’24” O y altitud de 1090 msnm [17]. De las partes aéreas de la especie *D. viscosa* se seleccionaron las hojas, las cuales fueron sometidas a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 15 días. El material seco se pulverizó con ayuda de un molino manual Estrella®. El polvo se maceró con el disolvente (1 L de acetona o metanol por 200 g de tejido vegetal seco) bajo condiciones de luz-oscuridad ambiental y 25 ± 3 °C, durante 72 horas. La mezcla se filtró y el disolvente fue eliminado totalmente por destilación a presión reducida con la ayuda de un evaporador rotatorio Büchi R-114, el proceso se realizó por triplicado. Los extractos se envasaron en

frascos de vidrio color ámbar para evitar la fotólisis. Las emulsiones acuosas de los extractos, utilizadas en los experimentos, se prepararon adicionando agua destilada con Tween® 20 al 0.5% (v/v).

Bioensayo

Los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa*, a diferentes concentraciones (Cuadro 1), se incorporaron a la dieta artificial durante su preparación. En recipientes de plástico de 10 ml se añadió 1ml de la dieta y una larva de estadio L2. Los recipientes se colocaron en una cámara de cría a 27 ± 1 °C, 60–70% HR y un fotoperíodo de 12-12 h luz-obscuridad.

Cada tratamiento (Cuadro 1) contó con cinco repeticiones que se distribuyeron en un arreglo completamente al azar. El conteo de los hemocitos se realizó doce días después de montado el experimento.

Conteo de hemocitos

Las muestras de hemolinfa se recogieron con una micropipeta 2-20 µl a partir de un corte fino en una de las propatas de la larva, en la que se le colocaron 2 µl de una solución "anticoagulante" para permitir el flujo de la hemolinfa y evitar, por algunos minutos, la lisis de las células. Los hemocitos circulantes libres se determinaron por observación directa en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico [10].
La solución "anticoagulante" contenía inhibidores de proteasas (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1mM ácido etilendiaminotetraacético, 0.2mM Na-p-tosil-L-Lisina clorometil cetona y 1mM leupeptina) disueltos en una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (100 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, pH 7.2) [19].

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas estadísticas para verificar la distribución normal (Shapiro-Wilk) y homosedasticidad (Levinne) de los datos. La diferencia entre los tratamientos se determinó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante una prueba de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. El análisis y procesamiento de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico JMP® versión 11 (SAS Institute Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar la actividad de los extractos de *D. viscosa* sobre la cantidad de hemocitos en la hemolinfa de *S. exigua*, se observó un número menor de hemocitos por mililitro en todos los tratamientos con extractos, diferentes significativamente al testigo agua. Sin embargo, sólo los extractos metanólicos a 1000 y 4000 ppm y el acetónico a 1000 ppm fueron diferentes estadísticamente a los dos controles negativos. El extracto metanólico a 4000 ppm fue el tratamiento en el que se encontró la cantidad menor de hemocitos ($5.56 \pm 0.27 \times 10^6 \cdot ml^{-1}$), mostrando porcentajes de disminución del 46.20 y 37.58 % contra los testigos agua y Tween® 20 respectivamente (Cuadro 1).

Los datos coinciden con lo reportado en otras investigaciones [8]–[10], en donde se encontró una disminución en la cantidad de hemocitos producida por diferentes producto botánicos.

Así, Sharma *et al*. [8] evaluaron el efecto del bioinsecticida comercial "Neem gold" sobre el hemograma de *Spodoptera litura*. Los tratamientos se aplicaron en la dieta artificial a 500, 1000 y 1500 ppm sobre larvas del último estadio, causando una disminución en el volumen de hemolinfa y en el recuento total

de hemocitos (THC · mm^{-3}), siendo significativamente menores al testigo. Los porcentajes máximos de disminución registrados fueron 23.59% a 500 ppm, 46.03% a 1000 ppm y 49.95% a 1500 ppm.
También, Sharma *et al*. [9] evaluaron el efecto de los aceites esenciales de *Acorus calamus* sobre los hemocitos de *Spodoptera litura*. Los tratamientos se aplicaron en la dieta artificial a 500 y 1000 ppm sobre larvas de último instar. Se registraron disminuciones significativas en el recuento total de hemocitos (THC · mm^{-3}) con respecto al testigo. Los porcentajes máximos de disminución registrados fueron 29.15% a 500 ppm y 49.05% a 1000 ppm.

Cuadro 1. Efecto de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa* sobre la cantidad de hemocitos en larvas de *S. exigua*

Tratamiento	hemocitos X 10^6 · ml^{-1}				% Disminución vs. Agua	% Disminución vs. Tween®
Agua (testigo)	10.33	±	0.84	a	----------	----------
Tween® 20 al 0.5% (testigo)	8.90	±	0.53	ab	13.80	----------
Extracto metanólico a 1000 ppm	7.23	±	0.64	c	29.96	18.75
Extracto metanólico a 2000 ppm	7.57	±	0.30	bc	26.69	14.96
Extracto metanólico a 4000 ppm	5.56	±	0.27	d	46.20	37.58
Extracto acetónico a 1000 ppm	6.52	±	0.61	cd	36.88	26.78
Extracto acetónico a 2000 ppm	7.56	±	0.80	bc	26.81	15.09
Extracto acetónico a 4000 ppm	7.71	±	0.33	bc	25.33	13.38

Las medias seguidas de la misma letra no presentan diferencia significativa ($p<0.05$, Tukey)

De manera similar, Zibaee y Bandani [10] evaluaron el efecto de los extractos metanólicos de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) sobre el hemograma y las reacciones inmunitarias celulares de la plaga *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutelleridae). Los extractos se incorporaron en la dieta a concentraciones de 5, 15 y 25%. Se encontró que el extracto al 25% fue el único tratamiento que resultó significativamente diferente, en el número total de hemocitos, al tratamiento control. El porcentaje de disminución provocado por dicha concentración fue de poco más del 40%. También se observó que los porcentajes de plasmatocitos y granulocitos, al aumentar las concentraciones, disminuyeron mostrando diferencias significativas.

Sin dejar de considerar que los trabajos [8]–[10] utilizaron especies vegetales diferentes a la considerada en la presente investigación, en todos ellos se encontró, también, una disminución en el número de hemocitos. Estos resultados sugieren que los extractos de plantas en niveles sub-letales son suficientes para disminuir la cantidad de hemocitos, lo que podría interferir con la inmunidad celular de insectos.

CONCLUSIONES

Los presentes hallazgos sobre la actividad de los extractos acetónico y metanólico de *D. viscosa* sobre los hemocitos presentes en la hemolinfa de larvas de *S. exigua*, revelan que tienen la capacidad de disminuir la cantidad de estos. Esta actividad biológica podría ser empleada como una estrategia

alternativa y sostenible para el control de insectos plaga. Sin embargo, es necesario realizar futuras investigaciones con el objetivo de conocer el modo de acción por el que los extractos vegetales causan la disminución en los hemocitos y comprobar si, realmente, esta disminución se traduce en una susceptibilidad mayor del insecto a los patógenos.

REFERENCIAS

[1] T. W. Culliney, "Crop losses to arthropods," in *Integrated Pest Management: Pesticide Problems, Vol.3*, 2014, pp. 201–225.

[2] C. J. A. Ruiz *et al.*, *Plagas de Importancia Económica en México: Aspectos de su biología y ecología. Libro Técnico Num. 2.* Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2013.

[3] S. Saeed, A. H. Sayyed, and I. Ahmad, "Effect of host plants on life-history traits of Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae)," *J. Pest Sci. (2004).*, vol. 83, no. 2, pp. 165–172, 2010.

[4] X. L. Zheng, X. P. Cong, X. P. Wang, and C. L. Lei, "A review of geographic distribution, overwintering and migration in spodoptera exigua H??bner (Lepidoptera: Noctuidae)," *Journal of the Entomological Research Society*, vol. 13, no. 3. pp. 39–48, 2011.

[5] S. A. G. A. R. P. A. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, "Manejo Fitosanitario en Hortalizas. Programa de trabajo 2015." 2015.

[6] M. Ishtiaq and M. a Saleem, "Generating susceptible strain and resistance status of field populations of Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) against some conventional and new chemistry insecticides in Pakistan.," *J. Econ. Entomol.*, vol. 104, no. 4, pp. 1343–1348, 2011.

[7] W. Murillo and D. F. Salazar, "Green tendencies in the agriculture for the handling and control of plagues," *Tumbaga*, vol. 1, no. 6, pp. 63–92, 2011.

[8] P. R. Sharma, O. P. Sharma, and B. P. Saxena, "Effect of Neem gold on haemocytes of the tobacco armyworm, Spodoptera litura (Fabricius) (Lepidoptera; Noctuidae)," *Curr. Sci.*, vol. 84, no. 5, pp. 690–695, 2003.

[9] P. R. Sharma, O. P. Sharma, and B. P. Saxena, "Effect of sweet flag rhizome oil (Acorus calamus) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae)," *Micron*, vol. 39, no. 5, pp. 544–551, 2008.

[10] A. Zibaee and A. R. Bandani, "Effects of Artemisia annua L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the Sunn pest, Eurygaster integriceps (Heteroptera: Scutellaridae), against Beauveria bassiana.," *Bull. Entomol. Res.*, vol. 100, no. 2, pp. 185–96, 2010.

[11] R. R. James and J. Xu, "Mechanisms by which pesticides affect insect immunity," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 109, no. 2. pp. 175–182, 2012.

[12] A. Zibaee, "Botanical Insecticides and Their Effects on Insect Biochemistry and Immunity," in *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, Publisher: InTech, 2011, pp. 55–68.

[13] H.-M. Niu *et al.*, "Clerodane diterpenoids and prenylated flavonoids from Dodonaea viscosa," *J. Asian Nat. Prod. Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 7–14, 2010.

[14] S. Q. De Oliveira *et al.*, "Isolation of three new ent-labdane diterpenes from Dodonaea viscosa Jacquin (Sapindaceae): Preliminary evaluation of antiherpes activity," *Phytochem. Lett.*, vol. 5, no. 3, pp. 500–505, 2012.

[15] L. L. Aldana, S. D. O. Salinas, R. M. C. Hernández, and O. M. Gutiérrez, "Efecto de Dodonaea viscosa en larvas de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)," in *Memorias del XVII Congreso Internacional De Ciencias Agrícolas.*, L. F. Escoboza García, F. Núñez Ramírez, and M. C.

Ruiz Alvarado, Eds. Mexicali, Baja California, México: Universidad Autónoma de Baja California, 2014, pp. 363–367.

[16] L. L. Aldana, S. D. . Salinas, O. M. Gutiérrez, E. M. E. Valdés, and M. C. R. Hernández, "Efecto de extractos de Dodonea viscosa y Serjania schiedeana en larvas de Spodoptera frugiperda.," in *SEGUNDO CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROPECUARIA. MEMORIA CIENTÍFICA.*, C. L. Aguirre Mancilla, J. G. Ramirez Pimentel, and R. Padilla Guerrero, Eds. Celaya, Guanajuato, México: Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología Agropecuaria A.C., 2014, p. 187.

[17] I. N. E. G. I. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, "Cartografía Geoestadística Urbana y Rural Amanzanada.," 2016. [Online]. Available: http://www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=17. [Accessed: 10-Dec-2016].

[18] F. Budia and V. M. E. Viñuela, "Estudios preliminares de los efectos del insecticida RH-5992 sobre larvas de distintas edades de Spodoptera exigua (Hübner)," *Boletín Sanid. Veg. Plagas*, vol. 20, pp. 401–408, 1994.

[19] S. Hernández-Martínez, C. Rivera-Perez, M. Nouzova, and F. G. Noriega, "Coordinated changes in JH biosynthesis and JH hemolymph titers in Aedes aegypti mosquitoes," *J. Insect Physiol.*, vol. 72, pp. 22–27, 2015.

UMBRAL DE SEQUÍA EN EL DESIERTO SONORENSE.

[1]Gaxiola-Morales, M.G. y [1]Brito-Castillo, L.

1. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Unidad Sonora, Campus Guaymas, Km. 2.35, Camino al Tular s/n, Estero de Bacochibampo, Guaymas, Sonora 85454, México.

*Autor para correspondencia: mgaxiola@pg.cibnor.mx, mc.gaxiola0mail.com

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

La sequía es un factor del clima que puede aumentar la degradación de las tierras y desertificación, particularmente en regiones áridas donde se observan actividades humanas con alto impacto negativo sobre los recursos bióticos. El sustento teórico de la presente investigación es el mecanismo térmico de mesoscala causante de la desertificación [1, 2]. Este mecanismo sugiere que en condiciones de elevada carga antrópica, el incremento del albedo (debido a que la superficie se torna clara por pérdida de vegetación y degradación del suelo), provoca enfriamiento superficial al absorber menos radiación solar, provocando debilitación de convección y reducción de formación de nubes y precipitación acentuando las condiciones de sequía. En esas condiciones se observa una relación inversa a nivel de mesoscala entre albedo y precipitación. Esta relación es conocida como hipótesis del albedo. Mediante el uso de valores del Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI, por sus siglas en inglés), observaciones de albedo y temperatura superficial, algunos autores [3] proponen una alternativa para monitorear la sequía; toman en cuenta los factores de radiación y evapotranspiración, como responsables de la modulación de la temperatura superficial. Se confirma una reducción del balance de radiación en función del incremento del albedo y disminución del coeficiente de fricción de la vegetación. El cambio de dominancia del factor de evapotranspiración al de radiación se pudo detectar a partir de un valor umbral de NDVI de 0.08±0.01. Este valor sirve de base para el monitoreo de la sequía pues indica el umbral en que la vegetación alcanza su máximo estrés. Por ello, surge el interés por identificar cuándo la dominancia de un factor respecto al otro cambia, mediante la verificación del valor umbral de NDVI detectado, ya que si bien este valor puede servir de base para el monitoreo de la sequía que ocurre cuando las condiciones desérticas están más acentuadas y domina el factor de radiación, resulta necesario hacer una verificación de su magnitud en tres sectores del Desierto Sonorense, tomando en cuenta el tipo de vegetación, influencia de urbanización y tipo de suelo. Los datos a utilizar provienen del Servicio Meteorológico Nacional, INEGI y CONABIO, así como datos mensuales de 2000-2015 del satélite ModisTerra (productos: MOD13Q1/06 para NDVI, MOD11C3/06 para temperatura superficial y MCD43C3/06 para albedo). Con estos últimos datos, por sector, se realizaran cálculos de regresión no lineal de segundo y tercer grado, obteniendo su significancia estadística.

Palabras clave: Sequía; Desierto Sonorense; NDVI; desertificación.

REFERENCIAS

[1] J. Otterman, Baring High-Albedo Soils by Overgrazing: A Hypothesized Desertification Mechanism, Science, New Series. Vol. 186, No. 4163, pp.531-533, Nov. 1974.

[2] J. Charney, Dynamics of deserts and drought in the Sahel, Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society, Vol. 101, pp. 193-202, Apr. 1975.

[3] I. Tereshchenko, A. Zolotokrylin, L. Brito-Castillo, C. Octavio, Seasonal Variation of Surface Temperature-Modulating Factors in the Sonoran Desert in Northwestern Mexico, American Meteorological Society, Vol. 51, pp. 1519-1530, Aug. 2012.

DINÁMICAS DE CARBONO Y NITRÓGENO EN SUELOS SALINOS CONTAMINADOS CON THINNER.

[1]Rengifo-Guerrero, C.A., [1]Piña-Zaballa, K.F., [2]Vásquez-Murrieta, M.S., y [1*]Franco-Hernández, M.O.

1. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Ciencias Básicas, Ciudad de México, CP: 07340
2. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Ciudad de México, CP: 11340.

*Autor para correspondencia: mofrancoh@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de los compuestos volátiles del thinner en las dinámicas de mineralización de carbono y nitrógeno en un suelo salino alcalino. Se utilizó thinner comercial y se caracterizó por cromatografía de gases. Se utilizó suelo salino del ex lago de Texcoco, previamente tamizado (<2mm) y ajustado al 40% de su CRA. Se plantearon tres tratamientos, suelo en condiciones normales (control), suelo con adición de thinner (ST) y suelo con adición de thinner y materia orgánica (STZ). Se incubaron a nivel de microcosmo durante 56 días, muestreando a los 0, 7, 14, 28 y 56 días. Se determinó producción de CO_2, nitrógeno amoniacal (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Se encontró que la producción de CO_2 fue mayor en los tratamientos STZ y ST (6300 y 3600 mg/kg ss) en comparación con el tratamiento control (1000 mg/kg ss). La concentración de NH_4^+ aumentó en el tratamiento ST (140 mg/kg ss), y disminuyó en el tratamiento control y STZ (3 mg/kg ss). El tratamiento STZ presentó las concentraciones más bajas de NO_3^- (11 mg/kg ss). Por el contrario, se presentó un aumento en el tratamiento control y ST. De acuerdo a los resultados, es posible que se hayan estimulado los microorganismos responsables de la amonificación, y por el contrario se afectaron las poblaciones nitritantes y nitratantes. La producción de CO_2 obtenida en ST sugiere que la población microbiana presente fue estimulada por la presencia del thinner, y que posiblemente tengan la capacidad de mineralizar sus componentes.

Palabras clave: Mineralización, Derivados de petróleo, Suelo salino.

INTRODUCCIÓN

Debido al incremento de la actividad económica e industrial, los suelos pueden ser fácilmente contaminados por compuestos orgánicos como consecuencia de residuos industriales y el abuso de pesticidas y herbicidas utilizados en el desarrollo de la agricultura. La contaminación en el suelo por productos derivados del petróleo es una de las mayores problemáticas ambientales siendo los hidrocarburos los contaminantes ambientales que se producen con mayor frecuencia [1]. Según datos de la Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH), entre el año 2010 y 2014 se presentaron alrededor de 1700 derrames de hidrocarburos en suelos mexicanos, afectando estados como Veracruz y Tabasco, entre otros.

La contaminación de suelos con sustancias como Benceno, Tolueno y Xileno (BTX) y su exposición puede causar graves daños de tipo neurológico e incluso provocar el cáncer [2]. Según Song [3], los BTX son los mayores componentes de la gasolina, y se usan ampliamente como solventes y como materias primas para la síntesis química de varias sustancias y cantidades considerables son dispuestos continuamente en ambientes naturales de manera accidental o intencional. La inclusión de hidrocarburos en el suelo puede afectar la capacidad del mismo para llevar a cabo sus funciones biológicas, disminuyendo su productividad biológica, disminuyendo la calidad ambiental y lo que impide conservar las condiciones adecuadas para el desarrollo de plantas y animales [4].

El thinner es utilizado comúnmente como disolvente y adelgazante de pinturas, y dentro de su composición se encuentran compuestos cancerígenos tales como Benceno y Tolueno [5]. Se han encontrado reportes de efectos dañinos para la salud humana por su uso indebido, además de los daños que podría causar tanto a los humanos como al ambiente por una inadecuada disposición final.
Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los compuestos volátiles del thinner en las dinámicas de mineralización de carbono y nitrógeno en un suelo salino alcalino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización del disolvente

Se utilizó disolvente (thinner) bajo una marca comercial. La caracterización se llevó a cabo utilizando una técnica de cromatografía de gases (Perkin Elmer - Clarus 580, USA) empleando un detector de ionización de llama (FID). La temperatura del inyector y del detector fueron de 150 y 200°C respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo constante a 70°C y el tiempo de la corrida fue de 7 minutos de acuerdo a lo establecido por Kelly & Harder [6]. El volumen de inyección fue de 0.5 µL. Se utilizó Nitrógeno como gas de transporte a un flujo de 1ml/min. El flujo de hidrógeno y aire fue de 35 y 350 ml/min respectivamente. La identificación y cuantificación de compuestos se realizó empleando la técnica del análisis externo con soluciones patrón con concentraciones definidas para cada compuesto y mediante la comparación de tiempos de retención [7].

Dinámicas de mineralización

Se depositaron 20g de suelo en frascos de vidrio de 150 ml. Posteriormente se llevaron a un proceso de incubación, en donde se ajustó su CRA al 40% de su CRA y se incubó por 7 días previo al inicio de los experimentos, con el fin de activar la flora microbiana presente [8]. Se plantearon tres tratamientos, suelo en condiciones normales (control), suelo con adición de thinner (ST) y suelo con adición de thinner y residuo de zanahoria como materia orgánica (STZ). La dinámica se llevó a cabo a nivel de microcosmos en recipientes plásticos de 1000 ml de boca ancha cerrados, y se llevó a incubación por 28 días en condiciones de invernadero. El recipiente plástico se abrió en intervalos regulares (semanalmente) con el fin de permitir un intercambio gaseoso y evitar la anaerobiosis. Dentro de los recipientes, se dispuso además de un vial con 20 ml de una solución de NaOH 1M para atrapar el CO_2 generado [9], y sobre la base del recipiente se colocaron 50 ml de H_2O destilada para evitar la desecación de las muestras [10]. Se tomaron muestras a los 0, 7, 14, 28 y 56 días, y se producción de CO_2, nitrógeno amoniacal (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). El CO_2 se determinó por medio de un titulador automático (Methrom – Titrino Plus 848, Suiza) empleando una solución de HCl 0.03N.

Nitrógeno Amoniacal, Nitritos y Nitratos

La medición de nitrógeno amoniacal (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) se llevó a cabo según la metodología propuesta por Ai et al. [11]. Para la extracción se tomaron 8g de muestra y se mezclaron con 40 ml de K_2SO_4 0.5M y se llevaron a agitación por un periodo de 30 minutos. Posteriormente se centrifugó y se guardó en congelación hasta su análisis. La determinación se llevó a cabo empleando un autoanalizador (Skalar – San Plus, Holanda). [12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del disolvente

La composición del thinner utilizado se presenta en la tabla 1. La composición obtenida en el thinner fue similar con lo indicado por Baydas et al. [5], quienes afirman que el thinner comercial contiene en su composición sustancias como Tolueno, Benceno y Xileno entre otros, siendo el tolueno el principal componente con un 60 – 70% de su composición. Por su parte, Shina et al., [13] reportó Naftaleno, isómeros de Etilbenceno y Xilenos (BTEX), los cuales no se encontraron en este estudio. El Benceno y Tolueno son neurotoxinas, y según la Organización para la Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional determinó que la exposición a un ambiente saturado con 2000 ppm de Tolueno es peligroso para la salud humana, se absorbe en sangre y es distribuido a todos los tejidos cognitivos y puede afectar el cerebro y el sistema nervioso [14]. El 2-butoxietanol provoca efectos hematológicos en ratas [15].

Tabla 1. Concentración de componentes de thinner y valor de CL50 por componente.

Compuesto	***Concentración (mg/ml)***
Metanol	*305*
Tolueno	*263*
2 – Butoxietanol	*48*
Hexanos	*70*
Benceno	*1.40*

Dinámicas de mineralización

El comportamiento en la producción de CO_2 se observa en la figura 1. Se encontró que la concentración de CO_2 en el tratamiento STZ fue aproximadamente 6 veces mayor que el tratamiento control. Así mismo, el tratamiento ST presentó una concentración de CO_2 hasta 3 veces mayor en el día 56. Lo anterior se debe posiblemente a una estimulación de la población microbiana causada por la presencia de los compuestos del thinner, además de que los residuos de zanahoria aportan una cantidad importante de azúcares como glucosa, los cuales pueden ser fácilmente metabolizados. Lo anterior concuerda con lo mencionado por Obire & Nwaubeta [16], quienes encontraron que la adición de hidrocarburos en un 5% con respecto al volumen de suelo favorece la proliferación de bacterias heterotróficas, las cuales incrementan su actividad sobre la materia orgánica del suelo.

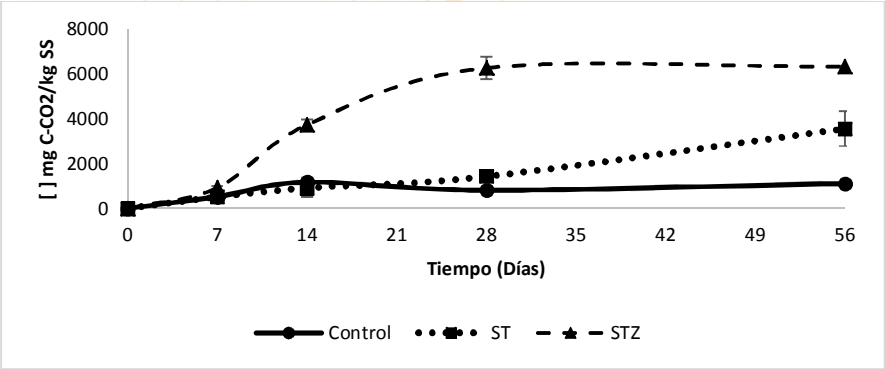


Figura 1. Concentración de CO_2 producido.

Por otra parte, se encontró que la inclusión de un contaminante derivado del petróleo causo alteraciones en el desarrollo normal del proceso de nitrificación en el suelo. De acuerdo con los resultados obtenidos en el tratamiento control, tanto la concentración de NH_4^+ como de NO_2^- permanecieron relativamente constantes, y por el contrario la concentración de NO_3^- se incrementó. Lo anterior obedece a un comportamiento de nitrificación normal, en donde se ha reportado que en condiciones aerobias la concentración de NH_4^+ va disminuyendo debido a que se oxida formando un ion de NO_2^-, y este a su vez se oxida hasta NO_3^-, por lo cual la concentración de NO_3^- va en aumento [17]. Por el contrario, se encontró que en el tratamiento ST la concentración de NH_4^+ aumentó hasta un máximo de aproximadamente 150 mg/kg ss, en comparación con los tratamientos control y STZ, en donde la concentración disminuyó desde 50 hasta 3 mg/kg ss y permaneció relativamente constante. Resultados similares fueron reportados por Obire & Nwaubeta [16] con contaminantes similares como la gasolina.

La concentración de NO_2^- en el tratamiento ST también resultó hasta 4 veces mayor a la obtenida en el tratamiento control y aproximadamente 3 veces mayor en el tratamiento STZ entre los días 0 y 14. Shen et al. [18] reportaron que en ambientes alcalinos con concentraciones elevadas de NH_4^+ se acumula gran cantidad de NO_2^-, lo cual altera los procesos de nitrificación. Según Wang et al. [19], los hidrocarburos causan ambientes anóxicos en el suelo, y esto puede favorecer procesos alternos a la nitrificación como por ejemplo la desnitrificación en donde el NO_3^- es reducido hasta NO_2^- y posteriormente este puede ser reducido a NH_4^+ o dar paso a la formación de compuestos como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2).

Con respecto a la concentración de NO_3^-, se observó que en el tratamiento ST la concentración disminuyó después del día 28. Así mismo, se encontró que en el tratamiento STZ la concentración de NO_3^- fue hasta 5 veces más baja durante todo el periodo de mineralización. Lo anterior fue similar a lo reportado por Pietri & Brooks [20] quienes encontraron que la concentración de NO_3^- disminuyó en el tratamiento con inclusión de contaminantes. De igual manera, Margesin et al. [21] indican que las presencias de grandes cantidades de materia orgánica dan como resultado la rápida disminución de los nutrientes inorgánicos disponibles como el nitrógeno y el fósforo. De acuerdo con las concentraciones de CO_2 obtenidas en el tratamiento ST y STZ, la población microbiana presente resultó estimulada y aumento su actividad microbiana, consumiendo rápidamente fuentes inorgánicas disponibles como el NO_3^-.

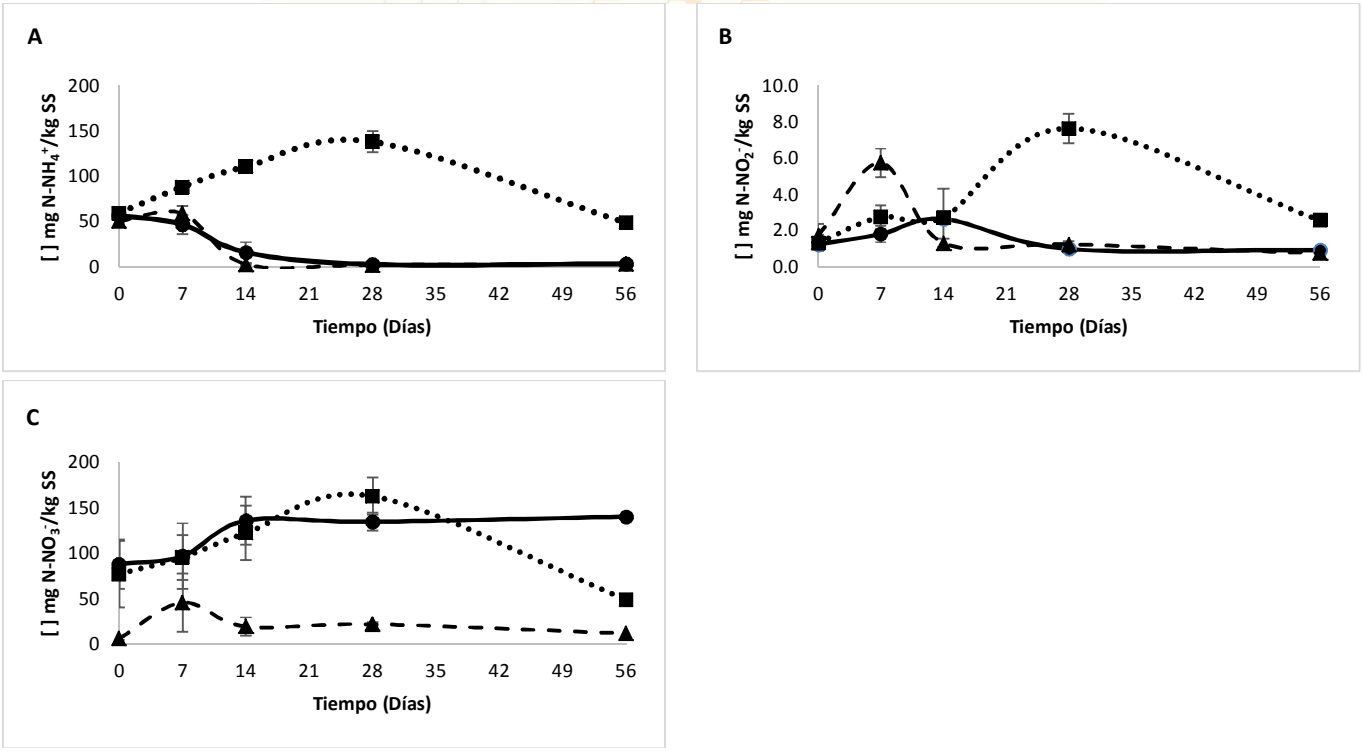


Figura 2. Dinámicas de A) NH_4^+, B) NO_2^- y C) NO_3^- (● Control, ■ ST, ▲STZ)

CONCLUSIONES

El thinner utilizado presentó en su composición sustancias tales como Tolueno, Benceno y 2 – Butoxietanol, reportadas como peligrosas tanto para los humanos como para el ambiente. La inclusión de thinner y materia orgánica en suelo salino provocó el aumento en la concentración de CO_2 posiblemente por la estimulación de los microorganismos presentes. El thinner afectó el desarrollo normal de los procesos de mineralización de nitrógeno, provocando el incremento en la concentración de NH_4^+ y NO_2^-. La inclusión de materia orgánica provocó una disminución en la concentración de NO_3^-.

REFERENCIAS

[1] R. Riffaldi, R. Levi – Minzi, R. Cardelli, S. Palumbo and A. Saviozzi. "Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil". *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 170, no. 1-4, pp. 3–15, 2006.

[2] O. Ezquerro, G. Ortiz G, B. Pons, M.T. Tena. "Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction". *Journal of Chromatography A*, Vol. 1035, pp. 17 – 22, 2004.

[3] H.G. Song. "Degradation of humus-bound metabolites generated from toluene and o-xylene in soil". *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 51, pp.129 – 132, 2003.

[4] A.K.J. Surridge, F.C. Wehner, and T.E. Cloete. "Chapter 6: Bioremediation of Polluted Soil". *Advances in Applied Bioremediation*, Vol. 17, pp. 103 – 121, 2009.

[5] G. Baydas, F. Ozveren, M. Tuzcu and A. Yazar. "Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats". *European Journal of Pharmacology*, Vol. 512, no. 2-3, pp.181–187, 2005.

[6] K. Kelly and B. Harder. "BTEX: Complete Resolution in Under 6.5 Minutes. The application book". *Phenomenex* Inc., Torrance, California, USA, 2003.

[7] H. Dongqiang, M. Wanyun and C. Dieyan. "Determination of Biodegradation Process of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes in Seabed Sediment by Purge and Trap Gas Chromatography". *Chromatographia*, Vol. 66, pp. 899 – 904, 2007.

[8] J.L. Moreno, F. Bastida, M. Ros, T. Hernández and C. García. "Soil organic carbon buffers heavy metal contamination on semiarid soils: Effects of different metal threshold levels on soil microbial activity". *European Journal of Soil Biology*, Vol. 45, no. 3, pp. 220–228, 2009.

[9] M.S. Vásquez-Murrieta, I. Migueles – Garduño, M.O. Franco – Hernández, E. Govaerts and L. Dendooven. "C and N mineralization and microbial biomass in heavy-metal contaminated soil". *European Journal of Soil Biology*, Vol. 42, no.2, pp. 89–98, 2006.

[10] F. Fernández-Luqueño, E. Vasquez – Nuñez, C. Martinez – Suarez, G. Salomon – Hernández, C. Valenzuela – Encinas, O. Franco – Hernández, J.M. Ceballos – Ramirez and L. Dendooven. "Bacterial community composition of a saline-alkaline soil amended or not with wastewater sludge and contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)". *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 7, no. 28, pp. 3605–3614, 2013.

[11] C. Ai, G. Liang, J. Sun and W. Zhou. "Responses of extracellular enzyme activities and microbial community in both the rhizosphere and bulk soil to long-term fertilization practices in a fluvo-aquic soil". *Geoderma*, Vol. 173-174, pp. 330 – 338, 2012.

[12] M. Christou, E.J. Avramides, J.P. Roberts and D.L. Jones. "Dissolved organic nitrogen in contrasting agricultural ecosystems". *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 37, pp. 1560–1563, 2005.

[13] S.N. Shina, and S.S. Zadi. "Gas Chromatography-Mass Spectral Analysis of Paint Thinner". *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 20, no. 8, pp. 6365-6368, 2008.

[14] A. Argo, D. Bongiorno, A. Bonifacio, V. Pernice, A. Liotta, S. Indelicato, S. Zerbo, P. Fleres, L. Ceraulo and P. Procaccianti. "A Fatal Case of a Paint Thinner Ingestion Comparison Between Toxicological and Histological Findings". *Am J Forensic Med Pathol*, Vol. 31, no. 2, pp. 181 – 191, 2010.

[15] A. Starek, W. Szymczak, L. Zapor. "Hematological effects of four ethylene glycol monoalkyl ethers in short-term repeated exposure in rats". Archives of Toxicology, Vol. 82, no. 2, pp.125-136, 2008.

[16] O. Obire and O. Nwaubeta. "Effects of refined petroleum hydrocarbon on soil physicochemical and bacteriological characteristics". *J. Appl. Sci. Envirom*, Vol. 6, no.1, pp. 39 – 44, 2002.

[17] S.A. Alrumman, D.B. Standing and G.I. Paton. "Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity". *Journal of King Saud University – Science*, Vol. 27, pp. 31–41, 2015.

[18] Q.R. Shen, W. Ran and Z.H. Cao. "Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification". *Chemosphere*, Vol. 50, pp. 747–753, 2003.

[19] Y. Wang, J. Feng, Q. Lin, X. Lyu, X. Wang and G. Wang. "Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge Wetland of China". *Chinese Geographical Science*, Vol. 23, no. 6, pp. 708–715, 2013.

[20] J.C. Pietri, and P.C. Brookes. "Nitrogen mineralisation along a pH gradient of a silty loam UK soil". *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 40, pp. 797–802, 2008.

[21] R. Margesin, A. Zimmerbauer and F. Schinner. "Monitoring of bioremediation by soil biological activities". *Chemosphere,* Vol. 40, pp. 339 – 346, 2000.

COMPARACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DEL VENENO DE TRES ESPECIES DE SERPIENTES DE CASCABEL (*Crotalus lepidus*, *C. molossus* y *C. scutulatus*) DISTRIBUIDAS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO.

*Chávez-Morales, R.M., Chávez-Almanza, J.A., Araiza-Velázquez, H., Sigala-Rodríguez, J.J., Hernández-Alfaro, E.T., Moreno-Hernández-Duque, J.L., Regalado-Soto, D.I.

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Fisiología y Farmacología, Departamento de Química, Departamento de Biología. Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, C.P. 20131, Aguascalientes, Ags. México.

*Autor para correspondencia: maria.chavezmo@edu.uaa.mx

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN

El veneno de las serpientes de cascabel es una mezcla compleja de enzimas, cada una ejerce un efecto biológico particular. Las serpientes de cascabel se distribuyen ampliamente en el estado de Aguascalientes, México. La caracterización de su veneno aporta beneficios para el perfeccionamiento de sueros y además, para el aislamiento de compuestos que tienen utilidad terapéutica. El objetivo de este trabajo fue hacer una caracterización comparativa entre tres especies de serpientes de cascabel: *C. lepidus, C. molossus* y *C. scutulatus*. Los animales fueron colectados durante meses lluviosos; sus venenos se obtuvieron *in situ*, conservados en nitrógeno líquido y liofilizados. Se hizo corrimientos de muestras por electroforesis. Se encontraron tres tipos de proteínas: metaloproteinasas, serinproteasas y fosfolipasa A2. El contenido proteico total fue mayor en la especie *C. lepidus*. Algunos ejemplares mostraron patrones de bandeo particulares: un ejemplar de *C. lepidus* mostró mayor contenido de metaloproteinasas que el resto de los organismos; sólo una serpiente de la especie *C. scutulatus* presentó fosfolipasa A2. En conclusión, el hábitat en el que se desarrollan las serpientes de cascabel de los géneros estudiados podría ejercer una influencia determinante en el tipo y cantidad de enzimas presentes en su veneno.

Palabras clave: Veneno; *Crotalus sp.*; Aguascalientes.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de los reptiles son mezclas complejas de péptidos y proteínas y su mordedura produce efectos variables e incluso antagónicos, cabe mencionar los efectos procoagulantes y anticoagulantes del veneno de las serpientes de cascabel. El género *Crotalus sp.* perteneciente a la Familia Viperidae, se distribuye ampliamente en todo México. En Aguascalientes habitan al menos cinco especies registradas, de las cuales *Crotalus lepidus, C. molossus* y *C. scutulatus* son las más abundantes [1].

El género *Crotalus sp.* tiene importancia biológica, social y económica, no sólo por los envenenamientos registrados, sino además, porque el veneno contiene compuestos químicos que afectan procesos fisiológicos que pueden ser aprovechados con fines terapéuticos, no sólo de éste género sino de otros [2], [3], [4].

Los venenos de serpientes contienen componentes altamente conservados entre distintos géneros: fosfolipasa A2 (PLA2), proteinasas de serina, metaloproteinasas, péptidos vasoactivos, inhibidores tipo Kazal, proteínas parecidas a lectinas tipo c, desintegrinas, factores de crecimiento endotelial vascular, nucleotidasas 5´, L-aminooxidasas, hialuronidasas y fosfodiesterasas [5].

Los signos y síntomas por mordedura de serpientes de cascabel consisten en hemorragias, hemoptisis, dolor alrededor del área mordida, edema de 10 cm o menos de diámetro y flictemas [6].

El veneno de *Crotalus molossus* contiene proteínas hemorrágicas y fibrinolíticas tipo metaloproteinasas causantes de edema y necrosis tisular; el efecto hemorrágico es causado por proteínas ácidas, excepto las proteínas catiónicas de *C. molossus* denominadas M4 (proteinasa que hidroliza fibrinógeno y fibrina, sin actividad hemorrágica) y M5 (con los mismos efectos anteriores y hemorrágica) [7], [8]. El veneno de *Crotalus lepidus* es proteolítico y fibrinolítico, contiene metaloproteinasas, fosfolipasas A2 (PLA2) y lectinas específicas de galactosa; produce necrosis muscular y hemorragia. Algunas subespecies, como la *C. l. klauberi* inducen aumento de la actividad de la creatin quinasa, lo que incrementa el efecto necrótico en músculo [9].

Aunque ciertas enzimas se conservan no sólo en un mismo género, sino en una familia, pueden ocurrir variaciones en el contenido del veneno. Múltiples factores representan fuentes de variación en la composición de los venenos, a niveles taxonómicos mayores o menores, puesto que, incluso pueden existir diferencias importantes en la composición entre organismos de una misma población. Ejemplos de estos factores son: la edad, el sexo, la alimentación, la disponibilidad de agua, la talla, el medio ambiente en el que se desarrolla el organismo, entre otros. Estas variaciones son el resultado de procesos tróficos adaptativos que se han presentado a lo largo de la evolución, aunque los mecanismos por los cuales ocurren no están dilucidados. Estas variaciones suelen determinar la magnitud de los efectos y las lesiones provocadas por una mordedura de serpiente [10], [11].

A nivel familia, el veneno de los Elápidos muestra más similitudes entre sus miembros, mientras que los Vipéridos (donde se encuentra el género *Crotalus sp.*) presentan mayor variación. En el veneno de los elápidos predominan toxinas pequeñas, particularmente 3FTXs (Three finger toxins, por sus siglas en inglés) y fosfolipasas A2, en tanto que, en el veneno de los vipéridos prevalecen "masas" enzimáticas mayores [12].

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo

El objetivo de la presente investigación fue realizar una caracterización del contenido proteico del veneno de tres especies de serpientes de cascabel (*Crotalus lepidus, C. molossus y C. scutulatus*) mediante SDS-PAGE, distribuidas en el estado de Aguascalientes, México.

Obtención del veneno

Para la colecta de las serpientes de cascabel se realizaron 17 visitas al campo, a partir del mes de abril y hasta julio, que abarcaron los meses cálidos y lluviosos para el estado de Aguascalientes, en un horario de 8:00 a 17:00 h. Se muestrearon los municipios de Aguascalientes, Calvillo, El Llano, Jesús María, San José de Gracia y Tepezalá. Los animales se manipularon con herramienta herpetológica: ganchos, pinzas, sacos y tubos. Los datos de colecta fueron registrados en una tabla. El veneno se obtuvo en el sitio de

colecta, por extracción manual sujetando a las serpientes por la parte posterior de la cabeza masajeando levemente sus sacos glandulares de veneno e insertando sus colmillos en tubos criogénicos cubiertos de parafilm. Una vez extraídos los venenos, fueron almacenados en ultracongelación (-90° Celsius) para posteriormente ser liofilizados y almacenados en refrigeración, protegidos de la luz.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas fue hecha por el método de Bradford usando albumina sérica bovina como estándar [13]. Se pesaron 0.01 g de veneno liofilizado y se diluyeron en 1 mL de agua desionizada; se agregó 3 mL de solución de Bradford. Las lecturas de absorbancia fueron cuantificadas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 280nm.

Método de separación de proteínas

El contenido proteico se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia duodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) [14]. Gel concentrador: 0.65 mL de acrilamida, 1.25 mL de 4x Tris-CI/SDS pH 6.8, 3.05 mL de agua desionizada, 0.025 mL de PSA y 0.005 mL de TEMED. Se mezclaron 15 µg de veneno con 1 mL de agua desionizada y 1 mL de β-mercaptoetanol. Se corrió un volumen total de 30 µL, de los cuales 10 µL correspondieron a la muestra de veneno liofilizado diluida en buffer. Las muestras se corrieron a 90 V, 4 h.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante pruebas de ANOVA y Tukey-Krammer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Datos de colecta

Se realizaron colectas de serpientes de cascabel de las especies de interés: *Crotalus molossus, C. lepidus* y *C. scutulatus*, en diferentes localidades de los municipios de Aguascalientes, Calvillo, El Llano, Jesús María, San José de Gracia y Tepezalá, Aguascalientes, México, durante la época de calor y lluvias que prevalecen en el estado desde el mes de abril, hasta julio. En total se colectaron 14 serpientes, 5 *C. lepidus*, 4 *C. molosus* y 5 *C. scutulatus* (Tablas 1, 2 y 3).

Tabla 1. Datos de colecta de *C. lepidus*. Ags: Aguascalientes, mm: milímetros.

Crotalus lepidus				
Ejemplar Fecha	Ejemplar 1 08/04/17	Ejemplar 2 20/05/17	Ejemplar 3 20/05/17	Ejemplar 4 10/06/17
Localidad	Montoro, Ags.	El Zepo, Sierra Fría, San José de Gracia	El Zepo, Sierra Fría, San José de Gracia	Montoro, Ags.
Sexo	macho	Hembra	macho	hembra
Longitud	649 mm	640 mm	830 mm	479 mm
Peso	275 g	420 g	700 g	65g

Tabla 2. Datos de colecta de *C. molossus*. EBAZ: Estación Biológica Agua Zarca, Ags: Aguascalientes, mm: milímetros.

Crotalus molossus					
Ejemplar Fecha	Ejemplar 1 20/05/17	Ejemplar 2 23/06/17	Ejemplar 3 24/06/2017	Ejemplar 4 01/07/17	Ejemplar 5 08/07/17
Localidad	Gracias a Dios, Ags.	Milpillas, Ags	El colorín, Ags	EBAZ, San José de Gracia	EBAZ, San José de Gracia
Sexo	hembra	hembra	hembra	macho	hembra
Longitud	448 mm	710 mm	323 mm	805 mm.	550 mm
Peso	132 g	165 g	37 g	415 g	140 g

Tabla 3. Datos de colecta de *C. scutulatus*. RSP: Río San Pedro, Ags: Aguascalientes, mm: milímetros.

Crotalus scutulatus					
Ejemplar Fecha	Ejemplar 1 14/04/17	Ejemplar 2 24/06/17	Ejemplar 3 01/07/17	Ejemplar 4 01/07/17	Ejemplar 5 08/07/17
Localidad	RSP, Ags	RSP, Ags	Maravillas, Jesús María,	El Llano	Las pilas, Tepezalá,
Sexo	hembra	hembra	macho	hembra	hembra
Longitud	395 mm	705 mm	872 mm	456 mm	580 mm
Peso	34 g	207 g	489 g	42 g	157 g

Cuantificación del contenido proteico por Bradford

Se elaboró una curva de proteínas a partir de una solución madre de albúmina sérica bovina, con concentración de 500 µg/mL, para obtener la siguiente recta:

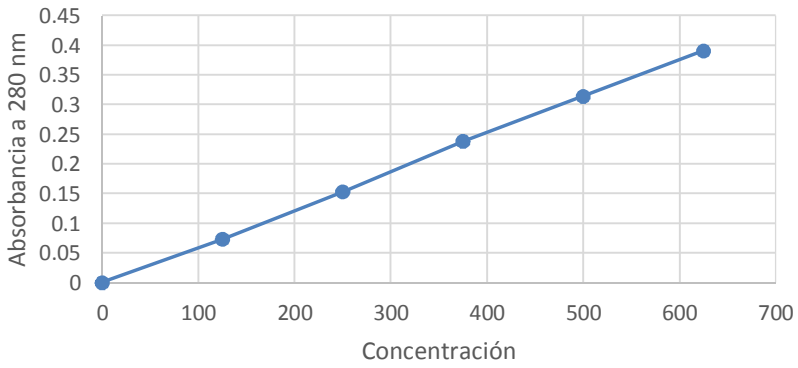


Figura 1. Curva de proteínas por mini Bradford.

Se calcularon las concentraciones de proteínas contenidas en 0.01 g de veneno liofilizado, obteniendo las concentraciones mostradas en la figura 2.

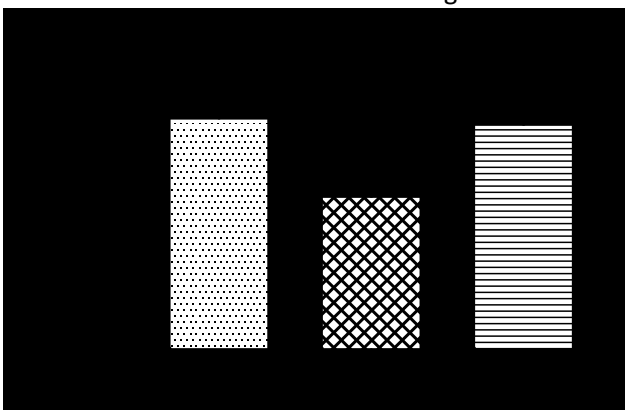


Figura 2. Concentración de proteínas (µg/mL) contenidas en 0.01 g de veneno liofilizado para tres especies de serpientes de cascabel.

Se encontró, que el contenido total de proteínas es mayor en las serpientes de la especie *C.* lepidus, mientras que la menor concentración la presentan ejemplares de *C. molossus.*

Separación de proteínas por electroforesis.

Se obtuvo un gel con perfiles similares de bandeo que se muestran en la siguiente figura. Se aprecia la separación electroforética de las proteínas contenidas en el veneno. Las familias de las proteínas se asignaron tomando en cuenta los pesos moleculares (Figura 3).

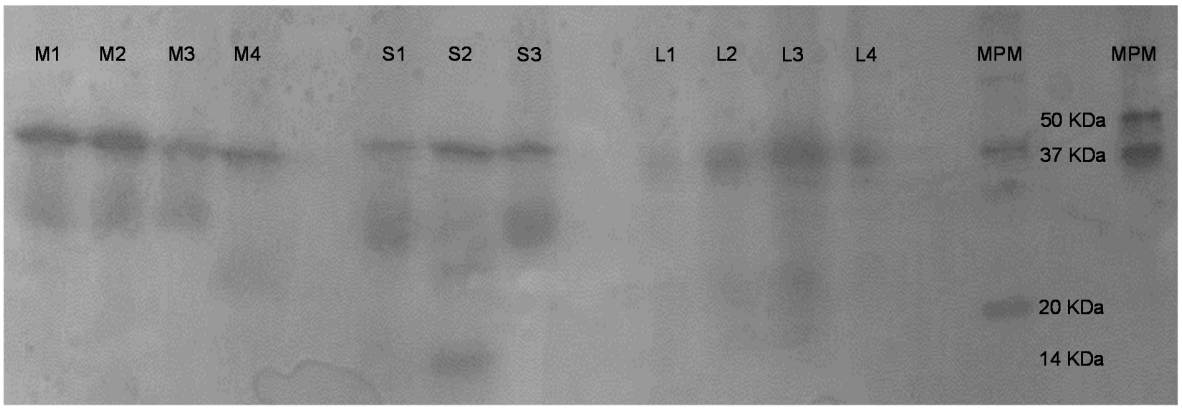


Figura 3. Gel de poliacrilamida SDG PAGE, con separación de bandas proteicas de 11 muestras de veneno liofilizado correspondientes, de izquierda a derecha: M1 a M4 = ejemplares 1, 2, 3 y 4 de la especie *C.molossus*; S1 a S3 = ejemplares 1, 2 y 3 de *C. scutulatus*, L1 a L4 = ejemplares de *C. lepidus*. MPM = marcador de peso molecular.

Se encontraron bandas frecuentes y prominentes de 37 y 50 KDa, además de una banda encontrada en una muestra de veneno de *Crotalus scutulatus* (S2) cuyo peso es aproximado a los 14 KDa. Las muestras mostraron bandas con pesos moleculares similares; los más prominentes fueron los de proteínas de entre 31 a 37 KDa y de entre 45 a 50 KDa, que corresponden a las serin proteasas y metaloproteinasas P-III respectivamente y fosfolipasa A2 de aproximadamente 14 KDa [12]

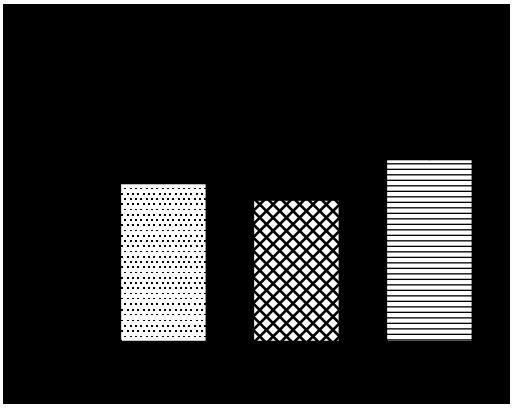


Figura 4. Pixelaje en bandas correspondientes a metaloproteinasas en *C. molossus*, *C. scutulatus* y *C. lepidus*. $p<0.05$.

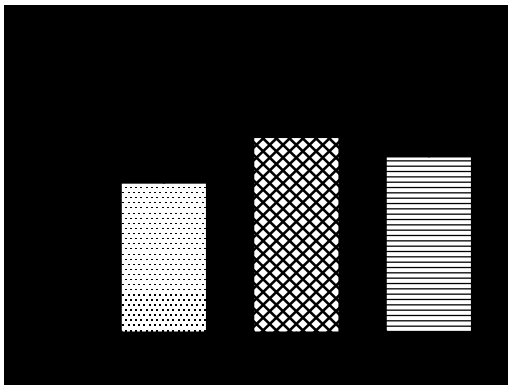


Figura 5. Pixelaje en bandas correspondientes a serinproteasas en *C. molossus*, *C. scutulatus* y *C. lepidus*.

Como se aprecia en la figura 4, en un análisis por pixelaje, las Metaloproteinasas se encuentran predominantemente en mayor cantidad en *C. lepidus*, en comparación con las otras dos especies,

guardando significancia estadística con *C. scutulatus*, que presenta en menor cantidad estas proteínas. El ejemplar que mostró la banda más pesada correspondiente a las metaloproteinasas, dentro de la especie *C. lepidus*, corresponde a una serpiente colectada en Sierra Fría, Aguascalientes, una zona de bosque de pino y encino. Los efectos de las metaloproteinasas son múltiples, aunque prevalece el hemotóxico. Una gran diversidad de enzimas tienen actividad proteolítica y sus efectos son prevalentemente hemorrágicos [15].

Con respecto a las Serin proteasas, como muestra la figura 5, no existe diferencia significativa en la intensidad del bandeo entre las especies estudiadas, aunque existen bandas más gruesas en *C. scutulatus*. Estas enzimas son conocidas como enzimas parecidas a la trombina, por ejercer efectos similares, libera fibrinopéptidos por destrucción del fibrinógeno, convirtiéndolo en fibrina que, al polimerizar forma trombos. Mientras que la trombina activa al factor XIII de la coagulación, las serin proteasas no lo hacen, así que el trombo formado por ésta última es disuelto rápidamente por la plasmina. Esto se traduce finalmente como una coagulopatía que conduce a la incapacidad de formar un trombo estable [16], [12].

La Fosfolipasa A2 sólo estuvo presente en un ejemplar de la especie *C. scutulatus*, colectada en el municipio de Tepezalá, Aguascalientes; los demás ejemplares no expresaron la banda correspondiente a esta proteína. Las fosfolipasas A2 son enzimas hidrolíticas destructoras de glicerofosfolípidos [17]. Estas enzimas ejercen efectos múltiples, tales como: miotóxico, neurotóxico, anticoagulante, hipotensor, hemolítico, inhibidor de la agregación plaquetaria y actividad proinflamatoria [18]. La función que cumplen las fosfolipasas con fines tróficos es la de paralizar a la presa, principalmente. Estas enzimas se han clasificado en 14 grupos, con base en el número y posición de los puentes disulfuro, y no todas son capaces de desencadenar los efectos antes señalados [17], [19]. Las fosfolipasas que se encuentran en el veneno de las serpientes de cascabel, pertenecen al grupo IIA, en función de sus características químicas [12]. En la presente investigación se encontró fosfolipasa A2 en un solo organismo, mientras que estuvo ausente en el resto de los ejemplares. Esta serpiente fue colectada en Tepezalá, un municipio de clima desértico donde, probablemente, los requerimientos alimenticios se vuelven más demandantes por la escasez de agua. Una posible explicación a este resultado es que estas enzimas pueden estar presentes o no en el veneno en función de la disponibilidad de alimento, siendo más necesarias cuando las presas son escasas.

De acuerdo con estos resultados es posible afirmar que algunos componentes del veneno son susceptibles de ser modificados en cantidad e incluso su presencia puede estar determinada por el hábitat en el que una serpiente se desenvuelve. Como muestran los resultados, las metaloproteinasas estuvieron presentes en cantidades aproximadas en todos los ejemplares colectados; los efectos hemorrágicos del veneno de las serpientes de cascabel son característicos del género. Por otra parte, las serin proteasas también estuvieron presenten en todas las muestras sin mostrar diferencias significativas entre las especies.

Conviene resaltar aquéllos ejemplares que mostraron patrones de bandeo intensos o únicos para ciertas enzimas, como los colectados en sitios de climas opuestos, pues un ejemplar de la especie *C. lepidus* colectado en Sierra Fría, San José de Gracia, presentó la banda más pesada para las metaloproteinasas, mientras que la serínproteasa sólo estuvo presente en un ejemplar de la especie *C. scutulatus*, originaria del municipio de Tepezalá; resulta interesante que la primera habita en una zona con vegetación vasta,

en donde el alimento no suele escasear, mientras que la segunda se desarrolla en un clima desértico, donde el agua y el alimento pudieran ser un factor limitante para su sobrevivencia. Estos hechos nos hacen afirmar que, para las tres especies estudiadas en esta investigación, el medio ambiente determina de manera importante el tipo y la cantidad de enzimas en el veneno.

CONCLUSIONES

Los venenos de las serpientes de cascabel *C. lepidus, C. molossus* y *C. scutulatus*, distribuidas en el estado de Aguascalientes, México, contienen enzimas metaloproteinasas, serinproteasas y fosfolipasas en cantidades diferentes, posiblemente debido a la influencia de factores fisiológicos y medioambientales. La presencia, ausencia y/o cantidad de estas enzimas puede variar incluso en una misma especie.

REFERENCIAS

[1] J. Vázquez-Díaz, *Anfibios y reptiles de Aguascalientes*, 2a ed.. ed., México, D.F.: México, D.F. : CONABIO CIEMA, 2005.

[2] S. Da Silva, S. Dias-Junior b, P. Baldasso c, D. Damico c, B. Carvalho a, A. Garanto a, G. Acosta, E. Oliveira e, F. Albericio e, A. Soares c, S. Marangoni d, and R. Resende i, "Vascular effects and electrolyte homeostasis of the natriuretic peptide isolated from Crotalus oreganus abyssus (North American Grand Canyon rattlesnake) venom.," *Peptides,* vol. 36, pp. 206-212, 2012.

[3] S. Janaina, A. Evangelista, A. Martins, N. Nascimento, M. Clauber, R. Alves, D. Toyama, M. Toyama, J. Evangelista, D. de Menezes, C. Manasse, M. Fonteles, M. Moraes, and H. Monteiro, "Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from Crotalus durissus cascavella venom. ," *Toxicon,* vol. 52, pp. 737-744, 2008.

[4] D. Tanaya, S. Bhattacharya, B. Halder, H. Biswas, S. Das, A. Gomes, and A. Gomes, "Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian N*aja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice.," *Toxicon,* vol. 57, pp. 1065-1072, 2011.

[5] J. Fox, "A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases.," *Toxicon,* vol. 62, pp. 75.82, 2013.

[6] I. Bioclon, "Guía para el tratamiento en intoxicaciones por animales ponzoñosos," 2013.

[7] T. Chen, and E. Rael, "Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from C*rotalus molossus molossus* venom that attacks complement. ," *Int J Biochem Cell Biol,* vol. 29, pp. 789-799, 1997.

[8] M. Hikari, D. Garcia, L. Beriamb, J. Novelloa, L. Rodrigues, and S. Marangonia, "Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from Crotalus durissus terrificus venom," *Toxicon,* vol. 41, pp. 1033-1038, 2003.

[9] Martinez, A. Rucavado, D. Lazcano, J. Gutiérrez, M. Borja, B. Lomonte, Y. Garza, and A. Zugasti, "Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies Crotalus lepidus lepidus, Crotalus lepidus klauberi and Crotalus lepidus morulus from Mexico.," *Toxicon,* vol. 71, pp. 84-95, 2013.

[10] J. Chippaux, V. Williams, and J. White, "Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation.," *Toxicon,* vol. 29, pp. 1279-304, 1991.

[11] S. Earl, G. Birrell, T. Wallis, P. St. Pierre, P. Masci, J. de Jersey, J. Gorman, and M. Lavin, "Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms.," *Proteomics,* vol. 6, pp. 6554-65, 2006.

[12] S. Mackessy, *Handbook of Venoms and toxins of reptiles*, First ed., p.^pp. 95-259, USA: CRC Press, 2010.

[13] M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Anal. Biochem,* vol. 72, pp. 248-254, 1976.

[14] U. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature,* vol. 227, pp. 680-685, 1970.

[15] J. Fox, and T. Serrano, "Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases.," *Toxicon,* vol. 45, pp. 969-85, 2005.

[16] V. Kumar, A. Abbas, and N. Fausto, *Robbins and Cotran pathological basis of disease: With student consult access.* , Philadelphia, 2004.

[17] D. Six, and E. Dennis, "The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization.," *Biochim. Biophys. Acta,* vol. 1488, pp. 1-19, 2000.

[18] R. Kini, "Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes.," *Toxicon,* vol. 42, pp. 827-40, 2003.

[19] R. Schaloske, and A. Dennis, "The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system.," *Biochim. Biophys. Acta,* vol. 1761, pp. 1246-59, 2006.

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CLIMÁTICAS EN LA PRESENCIA DE INCENDIOS FORESTALES A NIVEL NACIONAL Y REGIONAL DEL AÑO 2005 AL 2014.

*Chávez-Padilla, M., Benavides-Solorio, J. y Flores-Garnica, J.G.

1. CIRPAC. Interior Parque Los Colomos, Colonia Providencia, Guadalajara, Jalisco, México

*Autor para correspondencia: dr_manucha@hotmail.com

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

Los incendios forestales son mayormente causados por actividades antropogénicas (98%) y, en menor proporción, por condiciones naturales (2%). En cuanto a estas últimas, se incluyen factores como la topografía, los combustibles y el clima, los cuales son muy importantes para la propagación y el desarrollo del comportamiento del fuego. Los factores climáticos tienen un papel fundamental en los incendios forestales, ya que interactúan de manera conjunta con el ecosistema a nivel de resequedad de los combustibles y del ambiente, por lo que los datos meteorológicos son la base para determinar el peligro que pueda representar un incendio forestal en un futuro. Este estudio proporciona información sobre la influencia de diferentes variables climáticas sobre la superficie afectada por incendios forestales en un periodo de 10 años, desde el 2005 al 2014, según los registros obtenidos de la CONAFOR a nivel nacional, mientras que los datos climáticos fueron obtenidos de la CONAGUA y la NASA, ya que esta última proporciona información de la cual no se tiene registros sobre ciertas variables climáticas en México. La CONAFOR ha realizado estudios relacionados con incendios forestales utilizando variables de temperatura, precipitación, sequía e incidencia de huracanes, por lo que complementar esta información utilizando variables climáticas diferentes y de fuentes alternativas puede ser una gran herramienta para desarrollar estrategias para la prevención de incendios. Las variables climáticas son estudiadas de forma aislada para determinar el comportamiento e influencia de cada una. Además, el estudio no solo se realiza a nivel nacional, sino también, utilizado como propuesta, a nivel regional, ya que dividir a un país en regiones permite realizar estudios más minuciosos en cuanto a las variables climáticas representativas de una región y su relación con las demás regiones y a nivel nacional, y así calcular la importancia de cada variable en relación con las demás de cada región. De igual forma, dependiendo de cada país son las temporadas de ocurrencia de incendios, por lo que acortar el tiempo de los años a los meses de ocurrencia de incendios es una herramienta útil para determinar la importancia de las variables climáticas con la coincidencia de incendios dadas las condiciones climáticas de cierto tiempo del año.

Palabras clave: Incendios Forestales; Variables Climáticas; Precipitación; Temperatura; Humedad Relativa.

REFERENCIAS

[1] Benavides S. J. de D., Flores G. J. G., Torres M. O. 2017. Incendios Forestales en México durante el quinquenio 2005-2009 caracterizado por presentar leves cambios en la climatología nacional. INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Guadalajara, Jalisco. 74 p. En edición.

[2] Pyne, S. J., Andrews, P. L., Laven, R. D. 1996. IntroductiontoWildlandFire. 2nd ed. Wiley. New York. 808p.
[3] Rodriguez T., D., M. Rodriguez A. y F. Fernandez S. 2002. Educación e Incendios Forestales. Ed. Mundi Prensa. Mexico, D. F. 201 p.

EMPLEO DE HUMEDALES ARTIFICIALES DE FLUJO SUBSUPERFICIAL HORIZONTAL EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MUNICIPALE: UN CASO DE ESTUDIO.

[1]del-Real-Olvera, J., [2]Garza-Galicia, A. y [1]Merino-Solís, Ma.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C)

2. Universidad del Valle de Atemajac, (UNIVA).

*Autor para correspondencia: jdelreal@ciatej.mx

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

Los humedales artificiales son sistemas naturales empelados para el tratamiento de diversos tipos de aguas residuales, tales como: urbanas, municipales, industriales, agrícolas y mineras, entre otras. Dichos sistemas emplean plantas acuáticas como medio para la remoción de contaminantes [1]. A pesar de su sencillez en su operación y manejo, en estos sistemas se llevan a acabo procesos microbianos, biológicos, físicos y químicos de manera simultánea. En este estudio se realizó la construcción y operación de un sistema de un sistema experimental de humedales artificiales subsuperficiales de flujo horizontal para la depuración de las aguas municipales generadas en la comunidad de Tapalpa. Esta zona tiene un clima semihúmedo con lluvias de verano, inviernos secos y semi-cálidos. Según la clasificación climática de Köppen-Geiger, se define como un clima húmedo subtropical que hace factible la ubicación de estos sistemas. El sistema fue diseñado para funcionar con un caudal de agua de 11 m3/d, con el fin de remediar la generación de agua de 110 personas equivalentes. El sistema vegetal fue colocado sobre tezontle como soporte para la biocapa microbiana. Este material presenta alta porosidad (65% de volumen de poro para un tamaño de grano de 20-25 mm), esta característica le da alta relación área-volumen (390 m2/m3) en comparación con los medios sintéticos (164 m2/m3). Una vez concluida la construcción, se propuso un período de puesta en marcha de dos meses antes de iniciar el monitoreo, esto para asegurar una mayor cobertura vegetal y un desempeño estable en la eliminación de contaminantes [2]. Para el monitoreo del sistema se analizaron los parámetros de DBO, DQO, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, nitrito, nitrato y fósforo total, durante 8 semanas. Los principales parámetros que influyen en los mecanismos de remoción de nitrógeno y materia orgánica en el humedal es el pH, oxígeno disuelto y la temperatura [3]. Esto se debe a que los organismos presentes en el tratamiento biológico son sensibles a estos parámetros. Inicialmente, la descomposición de materia orgánica se determina por el equilibrio entre la carga de materia orgánica y la tasa de transferencia de oxígeno, que define las condiciones predominantes de los sistemas anaeróbico y aeróbico [3]. La materia orgánica, expresada como DBO y DQO, se descompone por procesos microbianos aeróbicos y anaeróbicos y también por procesos físicos, como sedimentación y filtración.

Palabras clave: Aguas residuales; humedales artificiales; tratamiento de aguas.

REFERENCIAS

[1] Merino-Solís, M.L.; Villegas, E.; de Anda, J.; López-López, A. TheEffect of theHydraulicRetention Time onthe Performance of anEcologicalWastewaterTreatmentSystem: AnAnaerobicFilterwith a ConstructedWetland. Water 2015, 7, 1149-1163.

[2] Matamoros, V.; Bayona, J.M. Behavior of emergingpollutants in constructedwetlands. Handb. Environ. Chem. 2008, 5, 199–217.

[3] Saeed, T.; Sun, G. A reviewonnitrogen and organicsremovalmechanisms in subsurfaceflowconstructedwetlands: Dependencyonenvironmentalparameters, operatingconditions and supporting media. J. Environ. Manag. 2012, 112, 429–448.

EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA EN LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA SOBRE LA VEGETACIÓN DEL BOSQUE DE LA PRIMAVERA.

[1]Aguilar Saldaña, J.D. y [2]*Espinoza Escalante, F.M.

1. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Sociales y Humanidades, Guanajuato #1045, Col. Alcalde Barranquitas, C.P. 44260, Guadalajara, Jalisco, México
2. Universidad Autónoma de Guadalajara, Departamento de Química, Av.Patria1201, Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco.

*Autor para correspondencia: froymario@edu.uag.mx

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

En México, la segunda ciudad con mayor índice de contaminación atmosférica es Guadalajara debido a que su ubicación geográfica y las barreras de tipo natural impiden la circulación del aire lo cual provoca que los contaminantes se incorporen a la atmósfera. Entre losprincipales contaminantes destacan eldióxido de carbono producido por el excesivo parque vehicular y la industrial; y las PM10 y PM2.5, que son arcillas depositadas en los suelos y se suspenden en el aire mediante erosión eólica. La vegetación y los bosques juegan un papel importante ante dichos gases de efecto invernadero, ya que transforman el CO_2 en oxígeno, purificando el aire. El incremento poblacional y el desarrollo tecnológico a los cuales ha estado expuesta la Zona Metropolitana de Guadalajara durante los últimos años, ha provocado un incremento en los niveles de contaminación ambiental. Dados los índices de contaminación atmosférica en esta región, los cuales están impactados por la actividad antropogénica y su relieve, es conveniente llevar a cabo un estudio que permita establecer e identificar cuáles son las zonas más vulnerables ante estas emisiones contaminantes. Actualmente el uso de tecnologías de censado remoto ha permitido desarrollar métodos para monitorear los cambios en la vegetación producto de las fluctuaciones climáticas severas. Una de estas metodologías es el Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI), la cual se basa en las propiedades de reflexión diferencial de la vegetación verde en las porciones visibles e infrarroja del espectro y es un sistema de monitoreo remoto de la vegetación. En este trabajo se utilizaron imágenes satelitales de la Zona Metropolitana de Guadalajara con metodología NDVI, para determinar el efecto de los contaminantes atmosféricos sobre la vegetación del bosque La Primavera.

Palabras clave: Contaminación atmosférica, Índice Normalizado de Vegetación, Imágenes satelitales.

REFERENCIAS

[1] Curiel Ballesteros, A., Garibay Chávez, G. y Hernández Trujillo, V. (2007). Particulas Suspendidas en el aire de Guadalajara. *Ciencia*, *58*(1), 1–11.

[2] Quattrochi, D.A. y Luvall, J.C. (1999). Thermal infrared remote sensing for analysis of landscape ecological processes: methods and applications. LandscapeEcology, 14(6), 577–598. http://doi.org/10.1023/A:1008168910634

LISTADO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES EN LA BARRANCA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA.

Santana-Acosta, L.E., Trejo-Calvillo, M.A., Martínez-Peña, B., Ismael-Mohamed, S., Ponce-Campos, P., y Sahagún-Godínez, E.

Universidad Autónoma de Guadalajara

Autor para correspondencia: miguel.trejo.c@hotmail.com

RESUMEN

Este trabajo se realizó con la intención de documentar la presencia de las especies de vertebrados que aun habitan en la zona de la cañada parque hundido Eca do Queiros y de demostrar que aún tiene importancia ecológica, así como hacer un listado de las especies documentadas y recalcar que es un área protegida del municipio de Zapopan y que esta debe conservarse lo menos alterada posible ya que en ella se sigue dando su propia fauna silvestre. El objetivo consistió en elaborar un listado de la Mastofauna, Ornitofauna y Herpetofauna que se encuentran y hacer una estimación de su abundancia en la cañada del parque hundido en Zapopan, Jalisco y del Jardín Botánico de la Universidad Autónoma de Guadalajara usando diversos recursos para la documentación de estos. Para la identificación de la Masto fauna se utilizaron trampas olfativas para fotografiar y documentar las huellas, GPS, foto trampas para obtener fotos de los ejemplares en sus actividades naturales y el método de captura y de liberación de ejemplares para documentarlos y tener fotos más cercanas y detalladas de cada ejemplar, por si fuera el caso de que alguno no utilizara normalmente el corredor biológico seleccionado. Ornitofauna: para esta sección del trabajo se empleó la tesis de la Bióloga Mónica Lomelí, tesis en la cual se identificaron y describieron todas las especies de Ornitofauna que habitan en la cañada y en el jardín botánico de la autónoma. Herpetofauna: también se hizo uso de las fotos trampas previamente mencionadas para documentar la Herpetofauna existente, trampas de túnel, GPS, vernier. Posterior a este listado se pretende realizar un estudio sobre la ecología de las especies encontradas en la zona de la cañada.

Palabras clave: Masto fauna; Ornito fauna; Herpeto fauna

COMUNICACIÓN CON MENÚ INTERACTIVO, A TRAVÉS DE LAS SEÑALES ELÉCTRICAS DEL OJO HUMANO.

Arredondo-Flores, L.A. y Olvera-Mariscal, A.I.

*Autor para correspondencia: alondra.olvera@edu.uag.mx

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

El ojo humano es un sistema óptico formado por un dioptrio esférico y una lente, que reciben, respectivamente, el nombre de córnea y cristalino, y que son capaces de formar una imagen de los objetos sobre la superficie interna del ojo, en una zona denominada retina, que es sensible a la luz. El ElectroOculoGrama (EOG) registra las variaciones de voltaje que ocurren con el movimiento angular del ojo, ya que la esfera ocular es desde el punto de vista eléctrico, un dipolo, con su parte positiva en la córnea y negativa detrás de la retina. El propósito de este experimento es crear una comunicación para las personas con ciertas discapacidades para la comunicación. A través de un dispositivo, permitiendo sensar las actividades eléctricas musculares que emite el ojo humano en cada movimiento; permite mover un menú con diferentes opciones acerca de las necesidades básicas de una personas como dolor, comer, entre otras.

USO DE PLANTAS PARA EL CONTROL DE LA EROSION EN CUERPOS DE AGUA.

[1]Sahagún-Godínez, E. y [2]Zavala-Aguirre, J.L.

1. Jardín Botánico y Herbario. Facultad de Ciencias Biológico-Agropecuarias. Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201. Zapopan, Jal.
2. Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Ciencias Biológico-Agropecuarias. Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201. Zapopan, Jal.

*Autor para correspondencia: esahagun@gmail.com

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

Los sedimentos que forman el lecho de un cauce, los bancos y la planicie de inundación han sido transportados desde el nivel más alto de la cuenca y depositados ahí por el flujo del agua. El tamaño del canal, la forma y el material del lecho cambian, tanto en el tiempo como en respuesta a los cambios en el flujo de agua y la carga de sedimento. Se considera que un canal es relativamente estable cuando su flujo de agua y su flujo de sedimentos están en equilibrio al paso del tiempo. La erosión del cauce es un proceso natural, pero se acelera por la eliminación de la vegetación estabilizadora de los bancos en el cauce. El uso de diferentes plantas es el método más empleado para restablecer el control de la erosión. Objetivo: Presentar una revisión de las principales tipos de plantas que se usan para el control de la erosión en cauces de agua. Se puede reducir la erosión del curso de agua mediante los siguientes pasos. 1. En ambientes rurales, excluir al ganado para reducir la presión sobre los bancos y permitir que la vegetación se establezca. 2. Reducir la pendiente a 45° y darle forma de "V" en lugar de "U". 3. Para el control de la erosión a largo plazo plantar una combinación de herbáceas nativas con sauces. Los sauces crecen rápidamente, por lo que proporcionan control de erosión mientras se establecen las plantas nativas. Entre las plantas nativas se usan juncos que sobreviven la inundación y ayudan a evitar la erosión de las partes bajas de los bancos. Los árboles como los sauces son buenos para los bancos superiores con mayores pendientes. Son de rápido crecimiento y tienen un sistema de raíces fuerte y profundo para fijar el banco y ayudar a controlar la erosión. Se requiere mantenimiento continuo para mantenerlos manejables. Los pastos acuáticos se usan para controlar la erosión en canales anchos y poco profundos diseñados para prevenir la erosión del suelo mientras drenan el agua de escorrentía de los terrenos adyacentes. Los cursos de agua con pastos funcionan mejor cuando la erosión se controla en la parte alta de la cuenca, de lo contrario la vía se llenará de sedimento y dejará de funcionar correctamente. La vegetación herbácea también

Palabras clave: Pastos, erosión, graminoides, sauces.

TASA DE DEGRADACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA, DURANTE UN CICLO ANUAL, DENTRO DEL APFF BOSQUE LA PRIMAVERA, JALISCO, MÉXICO.

[1]Castañeda-Robles, V.B., [1]Zaragoza-Araujo, U. y [1]*Zavala-Aguirre, J.L.

1 Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: jzavala@edu.uag.mx

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

El Bosque La Primavera con sus 140 mil años de existencia, es la más grande reserva ecológica que queda hacia el poniente del Área Metropolitana de Guadalajara, ha sobrevivido miles de años a múltiples circunstancias adversas, sin embargo, se ha visto disminuida ante la acción de los humanos que no queremos aprender la lección sobre la gran importancia que tiene cuidarlo para conservarlo. A pesar de ser objeto de muchos estudios taxonómicos, aún no se tienen antecedentes sobre los componentes principales de aporte de nutrientes al sistema y los esfuerzos de reforestación se han centrado principalmente sobre la especie *Pinus sp*. En el presente estudio se analizó la tasa de degradación de la materia orgánica vegetal y su relación con la composición arbórea dentro de una nanocuenca dentro del área de administración gubernamental del sistema forestal "La Primavera" durante el período otoño 2015-verano 2016. Se colectó material orgánico de los principales tejidos de las especies arbóreas dominantes (*Pinus oocarpa, Clethra rosei, Quercus magnoliifolia, Quercus viminea* y *Vachelia pennatula*); se enterraron muestras cuantificadas en zonas de diferentes estratos de cobertura arbórea utilizando la técnica de bolsas de degradación; se hicieron colectas a los 3, 6, 9 y 12 meses y se procedió a determinar el peso residual de la materia orgánica por especie y por tejido. Se detectaron patrones de incremento en las tasas de degradación diarias en relación directa al tiempo. En general, los valores máximos de tasa de degradación diaria para cada especie se presentaron en muestras con 12 meses de degradación y fueron los siguientes: *Pinus oocarpa* (0.00985), *Clethra rosei* (0.00684), *Quercus viminea* (0.00684), *Quercus magnoliifolia* (0.00578). También se obtuvieron tasas de degradación por tejido y por nicho ecológico. Las tasas de degradación corresponden a valores intermedios (0.005 – 0.010) de acuerdo al criterio de Petersen & Cummins (1974). En este estudio no fue posible determinar las tasas de degradación para *Vachelia pennatula*. Se recomienda seguir esta línea de investigación para conocer y cuantificar los factores que intervienen en la degradación de la materia orgánica en el ecosistema Bosque La Primavera.

Palabras clave: APFF Bosque La Primavera; Tasa de degradación; bolsas de degradación; Ciclo anual.

REFERENCIAS

[1] Petersen, R.C. & Cummins, K.W. 1974. Leaf processing in a Woodland stream. Freshwat. Biol. Vol. 4: 343-368.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

EL CONTROL QUÍMICO NO TÓXICO DEL MUÉRDAGO *Struthanthus interruptus* Mart. (LORANTHACEAE) EN UN ENTORNO URBANO.

[1]Rodríguez-Sánchez, A.A., [2]Sahagún-Godínez, E. y [3]Herrera-Larrasilla, T.

1. Departamento de Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias Biológico-Agropecuarias. Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201. Zapopan, Jal, México. 3Departamento de Química. Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres. Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201. Zapopan, Jal, México.

*Autor para correspondencia: esahagun@gmail.com

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

El arbolado ofrece numerosos beneficios a los habitantes de la ciudad, pero se encuentra afectado severamente por el muérdago Struthanthus interruptus, una planta hemiparásita que por ser una liana cubre rápidamente la copa de los árboles. Adicionalmente, las aves dispersan sus frutos de un árbol a otro por lo que es urgente encontrar una manera de controlar la formación de frutos. Actualmente, en la Zona Metropolitana de Guadalajara (ZMG) más de 25 colonias están afectadas por el muérdago, un problema a gran escala. La falta de tratamientos inocuos ha propiciado la búsqueda de un producto no tóxico y reciclable para aplicar al muérdago en el entorno urbano donde se desarrolla, sin que afecte a la ciudadanía. El objetivo de este estudio fue desarrollar un producto inocuo para controlar la reproducción y la expansión del muérdago en un entorno urbano. El tratamiento consiste en la aplicación del producto no tóxico y un surfactante que favorezca su adherencia al follaje, con la finalidad de reducir la capacidad fotosintética y el intercambio gaseoso del muérdago y así evitar la formación de flores y de frutos mediante la aplicación del tratamiento antes de la época de reproducción, y además reducir significativamente el crecimiento del muérdago en el resto del año, limitando su dispersión y expansión hacia nuevas áreas. Esta es una metodología y un enfoque innovadores. El 16 de Junio del 2017 se realizó una prueba piloto en las jardineras de la Universidad Autónoma de Guadalajara. Se seleccionó una planta adulta y 2 plántulas de aproximadamente 3 meses de haber germinado. Se aplicó el producto mediante una bomba aspersora de 8 L, rociando completamente la superficie foliar. Durante 9 semanas se hicieron observaciones dos veces por semana. Las plántulas murieron. En la planta adulta se observó la marchitez y caída de hojas y la marchitez del renuevo que la liana usa para extenderse a otras ramas, durante la primera semana, pero las fuertes lluvias deslavaron gradualmente el producto y su efecto se vio reducido, si bien no ha habido recuperación en forma de nuevas hojas o brotes, y siguen cayendo hojas afectadas por el producto. Se harán pruebas adicionales con muestras de 30 plantas para darle validez estadística y mejorar la efectividad del producto ajustando su composición. La información obtenida permitirá mejorar el control de las plantas parásitas en la Zona Metropolitana de Guadalajara sin afectar la salud de sus habitantes.

Palabras clave: hemiparásita; hospedante; no tóxico; Zapopan; México.

PRODUCTIVIDAD PRIMARIA NETA ÁEREA, DURANTE UN CICLO ANUAL, DENTRO DEL APF BOSQUE LA PRIMAVERA, JALISCO, MÉXICO.

[1]Reyes-Salazar, A.K., [1]Zaragoza-Araujo, U. y [1]*Zavala-Aguirre, J.L.

1 Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: jzavalaa@edu.uag.mx

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

El Área de Protección de Flora y Fauna "La Primavera" comprende la zona de traslape entre dos provincias florísticas: la Sierra Madre Occidental y las Sierras Meridionales o Eje Neo volcánico Transversal, y está constituida por áreas montañosas aisladas, donde se distribuyen diferentes comunidades vegetales conformadas por bosques de encino-pino, encino, pino, vegetación riparia y bosque tropical caducifolio. A pesar de ser objeto de muchos estudios taxonómicos, aún no se tienen antecedentes sobre productividad forestal de esta zona lo cual es necesario para conocer una referencia como parte de una línea base del ecosistema. Específicamente se determinó la productividad primaria aérea durante 12 meses dentro del área de administración gubernamental del sistema forestal "La Primavera". Se colocaron en forma aleatoria 21 canastillas con superficie de 1m2 en la zona de estudio y se realizaron colectas mensuales para determinación de peso seco. A partir de la productividad de los meses de octubre de 2015 a agosto de 2016 se obtuvo un valor de 1493 kg ha-1 año-1, superior al promedio nacional reportado por CONAFOR para bosques templados. Durante el período de estudio se encontró un comportamiento sigmoidal con punto de inflexión aproximadamente en el mes de febrero. Se continuará con el análisis de la zona de estudio para conocer los aportes parciales de las principales especies arbóreas.

Palabras clave: APFF Bosque La Primavera; Productividad primaria aérea; Ciclo anual.

DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN SEDIMENTOS Y LIRIO ACUÁTICO *Eichornia crassipes* (Solms-Laubach) DE LA LAGUNA DE CAJITITLÁN, JALISCO, MÉXICO.

[1]Bello-Chamorro, D., [1]Zavala-Aguirre, J.L. y [2]*Reyes-Rueda, J.

1. Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco.
2. Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco.

*Autor para correspondencia: jreyes@ittlajomulco.edu.mx

Área de conocimiento: Biología

RESUMEN

El mercurio (Hg) se considera uno de los metales más tóxicos en este planeta, por estar en estado líquido, sólido y gaseoso; esto le permite desplazarse fácilmente y tener una gran afinidad a la fase particulada en los cuerpos de agua. En la Laguna de Cajititlan existen factores naturales como la lluvia y antropogénicos como la deforestación, que pueden ser variables importantes en el movimiento de este metal a la laguna. Debido a que hasta el momento no existen estudios específicos de presencia de mercurio en sedimentos y Eichornia crassipes dentro de la Laguna de Cajititlan, es importante conocer si existe su presencia, para poder proponer una solución a los daños que pudiera causar este metal al ecosistema lacustre. Se estudió la presencia de Hg en la Laguna de Cajititlán, Jalisco, en los sedimentos y lirio (Eichornia crassipes), como parte del mecanismo de bioacumulación. El estudio de campo se realizó durante la temporada de lluvias 2012; las muestras se analizaron mediante Espectrometría de Absorción Atómica por vapor frío, en un equipo Varian/Agilent modelo AA24OFS, con la NOM 117 SSA1-1994. De acuerdo a los datos obtenidos, se confirmó que existe presencia de mercurio en sedimentos, lo cual concuerda con la NOM-004-SEMARNAT-2002 para Lodos y Biosólidos en aguas (17 mg/kg) y Avila et al., 2002 [1] (0.5 mg/kg) aunque en menor cantidad (0.0250-0.0517ppm). En lo correspondiente a Eichornia crassipes, aunque en este caso no existe una NOM para plantas, los datos se refirieron contra lo que reporta para aguas el CEASJALISCO en el 2015 [2] (0.014 mg/L), los límites máximos para Hg para productos de la pesca que marca la NOM-028-SSA1-1993 (1.0 mg/kg), el Codex Stan 193-1995 (Norma general del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos) para Metilmercurio en pescado (0.5 mg/kg) y Dominguez et al., 2016 [3] (0.325 mg/L) en lirio como fitorremediador; los valores in situ (0.0250-0.165ppm) fueron menores a los índices de referencia reportados. Se observó que las concentraciones en sedimento no se diferencian estadísticamente de las de Eichornia crassipes obteniéndose coeficientes de variación de 34.52% y 83.80 % respectivamente. Este estudio brindó la posibilidad de conocer las formas de contaminación, bioacumulación y biotransformación del Hg en la laguna de Cajititlán, y así conducir posteriores estudios para tomar medida

Palabras clave: Mercurio; sedimentos; lirio acuático.

REFERENCIAS

[1] Avila P.P., Zarazua O. G., Barceló Q. I., Rosas P. I., Diaz D. C.y Bussy B. A. L. 2002. Distribución de Mercurio en agua y sedimento de una presa mexicana. XXVIII Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, AIDIS. FEMISCA. Cancún, México. pp. 7.

[2] info.ceajalisco.gob.mx/sca/Laguna de Cajititlan-Mercurio (LC-01-San Miguel Cuyutlán), 2015.

[3] Domínguez M. C., Gómez S. S. y Ardila A. A. N. 2016. Fitorremediación de Mercurio presente en aguas residuales provenientes de la industria minera. Universidad la Gran Colombia. UGCCiencia, 22, 227-237.

TASA DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN UN LAGO TROPICAL DE LOS TUXTLAS, VERACRUZ.

[1]Sandoval-García, K., [1]García-Rodriguez, R.V., [2]Doyle, R.D., [3]Mora-Heredia, E., y [2,3]Dávalos-Lind, L.

1. Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA), Universidad Veracruzana, Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, 91190, A.P 575 Xalapa, Ver., Mexico
2. Center for Reservoir and Aquatic Systems Research, Baylor University, One Bear Place #97178, Waco, TX 76798.
3. Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO), Universidad Veracruzana, Mártires del 7 de agosto No. 12. Col Felipe Carrillo Puerto 91080 Xalapa, Ver., México.

*Autor para correspondencia: karenzulia@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología

RESUMEN

Los estudios limnológicos de lagos tropicales no reflejan las predicciones teóricas, debido a la escasa información. Característica de estos es la eutroficación, generada por el enriquecimiento de nutrientes como fósforo y nitrógeno favoreciendo la presencia de cianobacterias. El nitrógeno es indispensable en su desarrollo, pero, sólo es aprovechado como NH3 y NO - , cuando su concentración disminuye, estos organismos realizan "Fijación Biológica de Nitrógeno" (FBN) mediante la enzima nitrogenasa. La cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* es capaz de realizar este proceso confiriéndole ventaja en el ecosistema. La tasa de FBN es regulada por la disponibilidad de nutrientes, temperatura, irradiancia y régimen estacional. El presente estudio se llevó a cabo en el lago tropical de Catemaco, en las temporadas de lluvia y seca. Se cuantificó biomasa, heteroquistes y tasa de FBN de *C. raciborskii*, así como la concentración de nutrientes en el agua. Los resultados confirmaron un patrón temporal, correlación negativa con la variable nitrógeno y correlación positiva con heteroquistes. La biomasa fue alta, consistente con eutroficación. Mayores tasas de FBN se presentaron en temporada de seca que en lluvia.

Palabras clave Fijación de nitrógeno, *C. raciborskii*, lago tropical.

REFERENCIAS

[1] Doyle, R.D., Thad, S.J. y Forbes, M.G. 2010. Hot spots and hot moments of planktonic nitrogen fixation in a eutrophic southern reservoir. Lake and Reservoir Management. 26 (2): 95- 103.

[2] Scott, J.T. y Grantz, E.M. 2013. N2 fixation exceeds internal nitrogen loading as a phytoplankton nutrient source in perpetually nitrogen-limited reservoirs. Freshwater Science, 32(3):849–861.

[3] Rabalais Nancy N. 2013. Nitrogen in Aquatic Ecosystems. Ambio, Vol. 31, No. 2, Optimizing Nitrogen Management in Food and Energy Productions, and Environmental Change (Mar., 2002), pp. 102-112

[4] Figueredo, C.C., Rückert, G. V., Cupertino, A., Pontes, M.A., Fernandes, L.A., Ribeiro, S.G., Maran, N.R.C. 2014. Lack of nitrogen as a causing agent of Cylindrospermopsis raciborskii intermittent blooms in a small tropical reservoir Microbial Ecology. 87: 557–567.

ESTUDIO DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL PARA SU APLICACIÓN EN ESPECIES FORESTALES COMERCIALES.

[1*]Moreno-Valencia, F.D., [1]Plascencia-Espinosa, M.A., [1]Luna-de-Jesús, Karina, [2]Muñoz-Rojas, J.

1. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA), Instituto Politécnico Nacional. Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700.
2. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio 103-E, Cuidad Universitaria, BUAP. San Manuel, C.P. 72570. Puebla, Puebla México.

*Autor para correspondencia: biol.david.moreno@gmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN
Se realizó el aislamiento y selección de bacterias endofíticas y rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal de poblaciones silvestres de *P. pátula* y *P. montezumae*, grupos arbóreos de coníferas mexicanas utilizados con fines de reforestación debido a su crecimiento acelerado y alto rendimiento. Ochenta y siete cepas bacterianas fueron aisladas de plántulas de pino, purificadas y agrupadas por criterios morfológicos. Se evaluaron y seleccionaron cepas para producción de fitoreguladores de crecimiento con el reactivo Salkovski, solubilización de fosfato con el medio Pikovskaya y producción de quitinasa con el medio agar quitina coloidal. Treinta cepas mostraron al menos una de las actividades evaluadas, con niveles de producción de fitorreguadores en parámetros que van de 54.4 a 139 µg/ml, seis cepas resultaron positivas a la prueba de solubilización de fosfato con halos de 3.2 a 3.8 según el Índice de solubilidad aplicado, nueve cepas presentaron crecimiento completo con zonas claras alrededor de las colonias con halos de 1.2 a 2 cm. Con el presente trabajo, se propone dar el primer paso para desarrollar un sistema de aceleración de crecimiento para plantas de uso forestal.

Palabras clave: Promoción de crecimiento vegetal; mecanismos de acción; bacterias rizosféricas y endofíticas; reforestación.

INTRODUCCIÓN

México presenta una tasa elevada de deforestación, con un intervalo que va de 348,000 a 776,000 ha año-1 [1], aproximadamente se reforesta un 30% [2]; y de las plantas que se introducen, menos del 35% sobreviven [3]. Los bajos valores de supervivencia podrían deberse a la introducción de especies exóticas, la falta de seguimiento y cuidado de las plantas después del trasplante. Los programas de reforestación no toman en cuenta factores ambientales que contribuyen al crecimiento exitoso de las plantas. Por lo tanto, se debe realizar un estudio en el cual las plantas seleccionadas se sometan a diferentes niveles de stress para evaluar las condiciones factibles que se requieren para un mejor crecimiento.

Dentro de las prácticas que podrían favorecer la supervivencia y el crecimiento de las plantas durante este proceso se encuentra la aplicación de tecnología que contengan consorcios microbianos para la

contribución del crecimiento de la planta y que garantice su sobrevivencia al trasplante. Gracias a sus características como promotoras de crecimiento, se han desarrollado inóculos a base de bacterias que presentan mecanismos de acción directos o indirectos aplicados principalmente a cultivos, convirtiéndose en una herramienta biotecnológica viable que no tiene efectos adversos al medio ambiente. Además, estas bacterias al ser utilizadas en la regeneración artificial de bosques, incrementa el desarrollo de plántulas inoculadas en vivero que llevan en la rizosfera altas poblaciones microbianas benéficas, de esta forma, la planta actúa como medio para reintroducirlas al suelo, incrementando su crecimiento temprano y mitigando el stress al trasplante, desencadenando un mejor proceso de adaptación al suelo [4].

Especies forestales seleccionadas para pruebas

Dada su importancia dentro de los paquetes tecnológicos que la CONAFOR y las diferentes dependencias encargadas de esta labor, se han seleccionado para este trabajo dos especies forestales, *Pinus patula* y *Pinus montezumae*. Independientemente de los atributos que la dependencia le da a estas especies para reforestación, restauración y conservación de suelos, se les concede otras cualidades ecológicas que las hacen inmejorables para pruebas en viveros. *P. patula*, por su potencial productivo y capacidad para adaptarse a diferentes condiciones climáticas y suelos no forestales, es ampliamente utilizado para la producción de madera de aserrío y de material celulósico [5]. *P. montezumae* se ha utilizado con éxito en varios programas de reforestación, para la protección de cuencas hidrográficas y restauración de suelos degradados [6].

Por lo tanto, se propone dar el primer paso para desarrollar un Sistema de Aceleración de Crecimiento para Plantas de uso Forestal. Una vez probado su efecto en plántulas sembradas en invernadero, se pretende incrementar las poblaciones de microorganismos promotores de crecimiento vegetal por medio de las bacterias aisladas y analizadas bajo protocolos establecidos según su mecanismo de acción. El objetivo principal de este estudio es el aislamiento y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal aplicables a especies forestales comerciales caracterizando los metabolitos inductores de crecimiento vegetal según su mecanismo de acción de las bacterias seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de sitio de colecta

El sitio seleccionado para la recolección de material vegetal se basó en la distribución natural de las dos especies forestales seleccionadas. Para la especie *P. montezumae*, se realizaron muestreos en el Parque Nacional Malinche. Para *P. patula* la colecta se realizó en la Sierra de Tlaxco-Caldera-Huamantla.

Aislamiento de bacterias rizosféricas

Se aislaron a partir del suelo más adherido en la raíz de la plántula, por lo que éstas se transportaron al laboratorio para realizarlo en condiciones asépticas. El protocolo de aislamiento fue establecido de acuerdo a [7]. 200 µl de muestra de cada dilución se colocaron en los medios de cultivo seleccionados para ser extendidos por plaqueo, las placas se realizaron por triplicado en Agar Extracto de Levadura Manitol pH 7 [8] y Agar Nutritivo pH 6.8 [9] con el fin de obtener bacterias lo suficientemente separadas para su aislamiento, además de cuantificar de forma aproximada la abundancia de las bacterias que se están observando.

Aislamiento de bacterias endófitas

El Procedimiento para el aislamiento de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) endófitas se llevó a cabo de acuerdo a [10]. 200 µl de muestra de cada dilución se colocaron en los medios de cultivo seleccionados para ser extendidos por plaqueo.

Criterios para la determinación de morfotipos

El análisis de datos de la caracterización morfológica se hizo utilizando 32 marcadores morfológicos que representan las variables de evaluación de las características macroscópicas, las cuales fueron transformadas a datos binarios de correspondencia y no correspondencia (0,1). Se efectuó un análisis multivariado con conglomerados para distinguir la distancia morfológica existente entre los organismos determinados mediante la representación gráfica de un dendograma con el programa PAST 3 Versión 3.16 [11].

Caracterización de las bacterias aisladas según su mecanismo de acción

Detección de compuestos indólicos

Se utilizó un método colorimétrico para detectar compuestos indólicos utilizando el reactivo Salkowski [12] en las ochenta y siete cepas bacterianas aisladas de las dos especies forestales (*P. montezumae* y *P. pátula*) según el procedimiento descrito por [12, 13, 14]. Se dterminó la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway modelo 6305) a una longitud de onda de 530 nm (OD530). Esta longitud de onda se eligió ya que se utiliza de forma rutinaria en ensayos colorimétricos de auxina derivados de Salkowski [12].

Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos

Se determinó en medio de Pikovskaya modificado según el procedimiento descrito por [15, 16, 17, 18]. Se calculó el tamaño de los halos por medio del Índice de Solubilización: IS=A/B (Donde: A= diámetro de la colonia + diámetro del halo y B= diámetro de la colonia). Se seleccionaron las cepas que muestran índices de solubilización mayores a 3 cm. Las mediciones se realizaron a los 3 y 7 días respectivamente después de la inoculación, con el fin de evaluar el comportamiento de las cepas a través de los días.

Producción de Quitinasa

Las bacterias aisladas se sembraron en agar quitina coloidal [19]. Después de incubación a 20° C durante 20 días, las placas se revisaron para evaluar el crecimiento bacteriano y el grado en que la quitina produce un halo de inhibición que rodea las colonias [20].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colecta de muestras.

Se realizaron 2 colectas en el Parque Nacional Malinche y una colecta en la Sierra de Tlaxco-Caldera-Huamantla. En cada uno de los sitios seleccionados se realizó un recorrido identificando las plántulas viables para el aislamiento de BPCV. Los criterios que se seleccionaron para esto fueron: sin plaga ni daño alguno, con buenas características fenológicas, hojas sin clorosis. A cada uno de estos se realizaron mediciones dasométricas y humedad del suelo. Las plántulas se transportaron al laboratorio en su totalidad para realizar el aislamiento en condiciones asépticas.

Como resultado de la caracterización morfológica mediante el análisis estadístico por conglomerados, se obtuvo un dendograma basado en los morfotipos determinados que exhibe el grado de distancia entre

ellos (Figura 1). Se obtuvieron 35 morfotipos bacterianos aislados de las dos especies de coníferas descritas en este estudio (*P. montezumae* y *P. patula*).

Aislamiento de bacterias de P. montezumae (Parque Nacional Malinche)
Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC), dando como resultado $2x10^8$ para bacterias rizosféricas y $1.5x10^7$ para endófitas (Figura 2). Se aislaron un total de 30 cepas de las cuales 17 pertenecen a la rizósfera y 13 a la raíz de *P. montezumae.* Se caracterizaron 15 morfotipos, 9 corresponden a la rizósfera y 6 a la raíz (Figura 3).

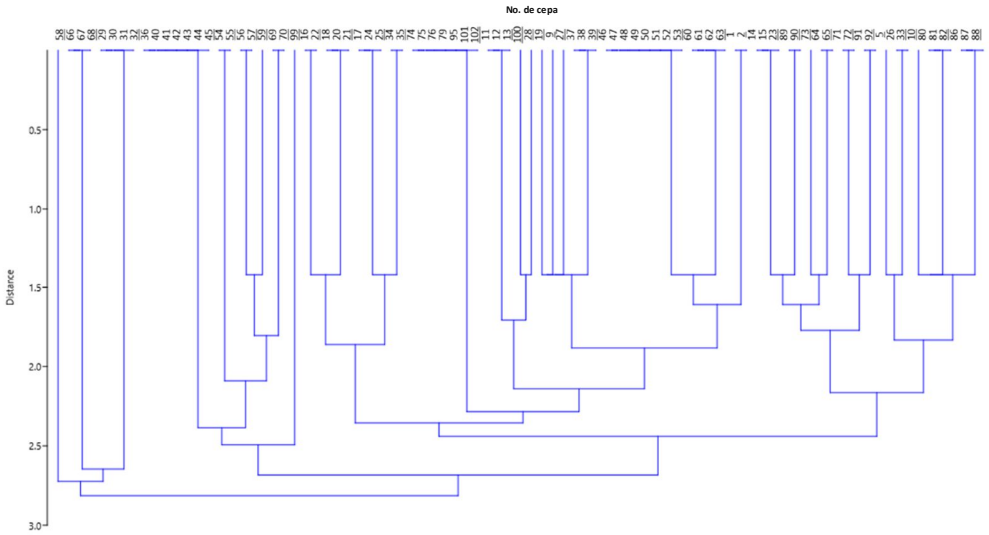


Figura 1. Caracterización morfológica de los microorganismos aislados de *P. montezumae* y *P. patula*.

Aislamiento de bacterias de P. patula (Sierra de Tlaxco-Caldera-Huamantla)
Se determinaron las UFC, dando como resultado $5x10^7$ para bacterias rizosféricas y $4x10^7$ para endófitas (Figura 4). Se aislaron un total de 57 cepas de las cuales 41 pertenecen a la rizósfera y 16 a la raíz de *P. pátula*. Se caracterizaron 20 morfotipos, 14 corresponden a la rizósfera y 6 de la raíz (Figura 5).

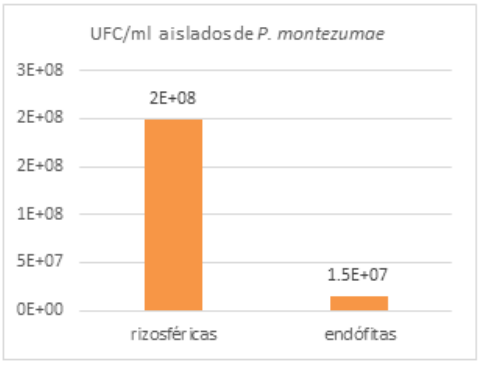


Figura 2. Cantidad de UFC/ml aisladas del microbion de la raíz (rizosférico y endofítico) de *P. montezumae*.

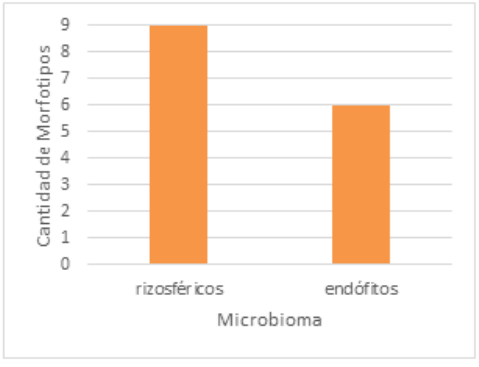


Figura 3. Cantidad de morfotipos aisladas del microbioma de la raíz de *P. montezumae*.

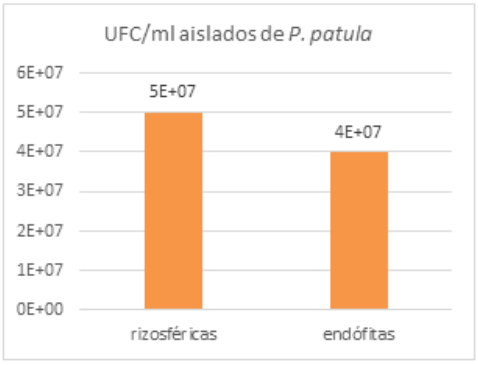


Figura 4. Cantidad de UFC/ml aisladas del microbioma de la raíz de *P. patula*.

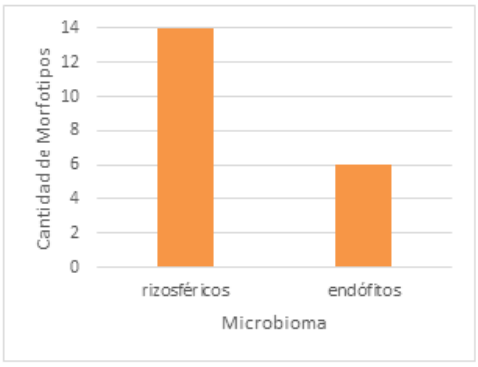


Figura 5. Cantidad de morfotipos aisladas del microbioma de la raíz de *P. patula*.

Los microorganismos no están distribuidos regularmente en el suelo pues hay un mosaico discontinuo de microambientes, aquéllos favorables para el desarrollo microbiano se caracterizan por su limitada extensión en el tiempo y en el espacio. El microbioma de la raíz (rizosférico y endofítico) puede desarrollarse sobre la base de presiones de selección positivas y negativas que se producen como resultado de la composición de exudados radiculares. Las bacterias del suelo dependen en gran medida de fuentes exógenas de carbono tanto para la energía, como para el crecimiento y desarrollo. La liberación de ciertos compuestos específicos por las raíces de las plantas seleccionan el número limitado de bacterias que son capaces de utilizar esos compuestos. Además, los exudados de raíz son generalmente específicos de plantas y el uso de estos compuestos específicos a menudo actúa como señales para establecer la afinidad de una planta para bacterias particulares [21].

Caracterización de las bacterias aisladas según su mecanismo de acción
Detección de compuestos indólicos
Quince cepas fueron positivas a la prueba de detección de compuestos indólicos con el reactivo Salkovsky obteniendo un color rojo claro con valores que van de 54.4 a 139 µg/ml (Figura 6). Cuatro cepas se aislaron de la rizósfera y una endófíta de *P. montezumae*. En cuanto a las cepas aisladas de *P. patula*, un total de siete fueron rizosféricas y tres endófitas. En esta investigación se preparó el reactivo de Salkowski con ácido sulfúrico y se probó a diferentes relaciones estableciéndose la 1:4 como la de mejor sensibilidad para la determinación de las concentraciones. La cepa C22M*Pm* aislada de *P. montezumae* es la mayor productora de índoles según los datos arrojados por la prueba colorimétrica con concentración de índoles de 139 µg/ml (Tabla 1).

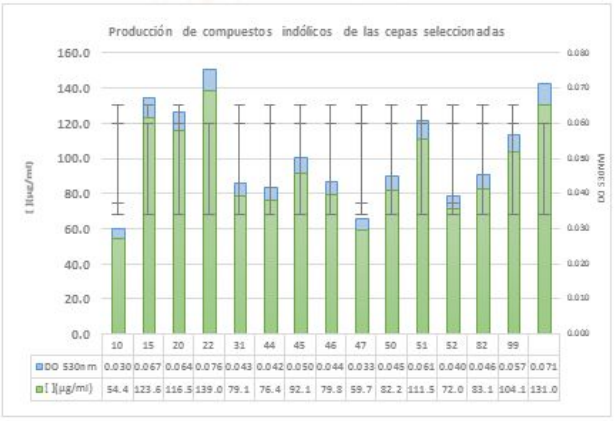


Figura 6. Producción de compuestos indólicos por las cepas aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

Tabla 1. Producción de índoles en las cepas aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

No de cepa	Sustrato	Especie	[ ](µg/ml)
C10M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	54.4
C15M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	123.6
C20M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	116.5
C22M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	139.0
C31M*Pm*	Endófita	*P. montezumae*	79.1
C44ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	76.4
C45ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	92.1
C46ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	79.8
C47ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	59.7
C50ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	82.2
C51ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	111.5
C52ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	72.0
C82ST*Pp*	Endófita	*P. patula*	83.1
C99ST*Pp*	Endófita	*P. patula*	104.1
C100ST*Pp*	Endófita	*P. patula*	131.0

Se ha encontrado que un porcentaje alto de bacterias rizosféricas (típicamente ~ 85%) sintetiza IAA [21] y lo utiliza como una fuente de carbono para su crecimiento [22]. El reactivo de Salkowski empleado en el método colorimétrico permite la oxidación del compuestos indólicos por sales férricas; cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso dependiendo la concentración del ácido indol-3-acético (AIA) presente [14], sin embargo, colores rojizos son un indicativo de la producción de AIA y ácido indól pirúvico (AIP) [12]. En microorganismos se han propuesto, al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis del ácido indol acético (AIA) a partir de triptofano (Trp) [23], siendo las más predominantes la vía vía del indol 3-piruvico (AIP) y ácido 3-acetamida (AIM) [24]. Existe un patrón de biosíntesis de AIA característico de la interacción planta-microorganismo que depende específicamente de rol ecofisiológico de la especie bacteriana que interactúa, siendo estas fitopatogénicas o promotoras del crecimiento [25].

Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos

Seis cepas resultaron positivas en la prueba de Solubilización de fosfatos con el medio Pikovskaya mostrando zonas caras alrededor de la colonia, lo que indica que estas bacterias solubilizan fosfato inorgánico insoluble. El rendimiento mostrado por estas bacterias en cuanto al Índice de Solubilización (IS) aplicado fue de 3.2 a 3.8. La cepa con un IS más alto fue la C21M*Pm* con 3.8 aislada de *P. montezumae*, en contraste con las cepas aisladas de *P. patula* que tuvieron todas un IS de 3.2 (Tabla 2; Figura 7). Las cepas de *P. montezumae* y *P. patula* que presentaron halos en el medio Pikovskaya fueron aisladas de la rizósfera de estas especies de pinos.

Tabla 2. Rendimiento por cepa de la prueba de solubilización de fosfatos e índice de solubilización de las diferentes cepas aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

Cepa	Sustrato	Especie	Tamaño del halo (cm)	Tamaño de colonia (cm)	Índice de solubilización (cm)	Desviación estandar*
C20MPm	Rizósfera	*P. montezumae*	1.1	0.5	3.2	±0.1
C21M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	0.85	0.3	3.8	±0.1
C22M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	1.1	0.45	3.6	±0.08
C38ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	1.3	0.65	3.2	±0.1
C52ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	1.3	0.5	3.2	±0.1
C61ST*Pp*	Rizósfera	*P. patula*	1.2	0.55	3.2	±0.3

*Promedio ± del error estándar en los tres experimentos realizados por separado.

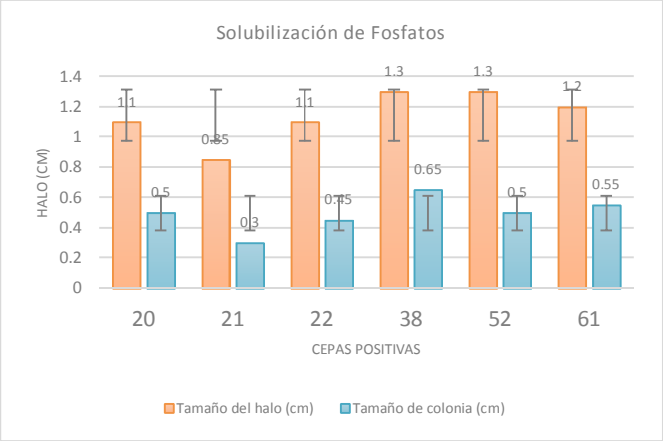


Figura 7. Rendimiento de las cepas solubilizadoras de fosfato aisladas de *P. montezumae y P. patula.*

Una concentración considerablemente mayor de bacterias solubilizadoras de fosfato se encuentra comúnmente en la rizósfera en comparación con el suelo no rizosférico [26]. Los fosfatos se ponen a disposición por las raíces de las plantas o por microorganismos del suelo, por lo tanto, estos juegan un papel en la corrección de la deficiencia de fósforo de las plantas [27]. Las condiciones en que se encuentra el pH del suelo son determinantes para la solubilización del fosfato; cuando los suelos presentan pH muy ácidos, la solubilidad del aluminio y el hierro es elevada, y estos elementos se precipitan con el fósforo en forma de compuestos insolubles, no aprovechables para las plantas; a su vez, con un pH alcalino también es limitada la disponibilidad del fosforo por la formación de fosfatos de calcio (apatitas) insolubles. A valores de pH cercanos a la neutralidad se presume una dinámica alta de los fosfatos de calcio apatítico y no-apatítico, que se solubilizan con mayor facilidad; también los microorganismos realizan la mayor mineralización del fosforo orgánico [15]. El tipo de suelo también puede ser una consideración importante cuando se prueban BPCV en un entorno forestal. Muchos de los suelos forestales son ácidos, especialmente los de los bosques de coníferas, y algunas BPCV son sensibles a las condiciones de pH bajo [28].

Producción de Quitinasa

Nueve cepas presentaron crecimiento y halos alrededor de las colonias en Agar Quitina Coloidal después de siete días de incubación a 30°C, con rangos en el tamaño de los halos de 1.2 a 2.1 cm (Figura 8).

Todas las cepas seleccionadas crecieron bien en agar de quitina y tuvieron un rendimiento superior en la producción de quitinasa mostrando zonas claras alrededor de las colonias. Dos cepas se aislaron de la rizósfera de *P. montezumae* y siete de *P. patula* de diferentes sustratos, seis de la rizósfera y una endófita (Tabla 3).

Las bacterias productoras de quitinasa se encuentran tanto en la rizósfera como en el interior de la planta, esto obedece a que las plantas pueden "seleccionar" su microbioma para tener colonizadores bacterianos beneficiosos, incluyendo aquellos que viven dentro de los tejidos vegetales [29]

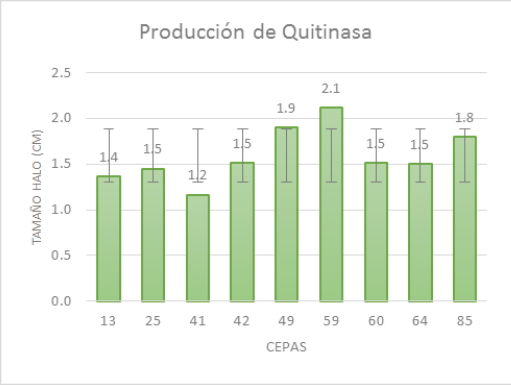


Figura 8. Rangos en el halo alrededor de las colonias de las cepas productoras de quitinasa aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

Tabla 3. Resultados de la prueba de producción de quitinasa de las cepas aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

No de cepa	Sustrato	Especie	Quitinasa*	Tamaño halo (cm)	Desviación estándar~
C13M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	a	1.4	±0.6
C25M*Pm*	Rizósfera	*P. montezumae*	a	1.5	±0.05
C41ST*Pp*	Rizósfera	*P. pátula*	a	1.2	±0.1
C42ST*Pp*	Rizósfera	*P. pátula*	a	1.5	±0.1
C49ST*Pp*	Rizósfera	*P. pátula*	a	1.9	±0.6
C59ST*Pp*	Rizósfera	*P. pátula*	a	2.1	±0.2
C60ST*Pp*	Rizósfera	*P. pátula*	a	1.5	±0.4
C64ST*Pp*	Rizósfera	*P. pátula*	a	1.5	±0.2
C85ST*Pp*	Endófita	*P. pátula*	a	1.8	±0.3

Las BPCV se comportan como agentes de biocontrol mediante la producción de enzimas tales como la quitinasa, celulosa, b-1,3 glucanasa, proteasa o lipasa, que inducen la lisis de paredes celulares de hongos [30]. En particular, la quitinasa se considera crucial para la actividad de biocontrol exhibida por BPCV frente a hongos fitopatógenos [31, 32, 33, 34, 35].

REFERENCIAS

[1] A. Velázquez and G. Bocco. "La ecología del paisaje y su potencial para acciones de conservación de ecosistemas templados de montaña"; En: Sánchez, O. Monroy, E. Vega, E. Peters, and C. Donovarros (comps.). "Conservación de Ecosistemas Templados de Montaña en México". Instituto Nacional de Ecología. 306 p., 2003.

[2] SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. "Informe de la Situación del Medio Ambiente en México". Compendio de estadísticas ambientales. México, D.F., 2012.

[3] O. Masera, M. R. Bellon and G. Segura. "Forestry Options for Sequestering Carbon in Mexico: Comparative Economic Analysis of Three Case Studies". Critical Reviews in Environmental Science and Technology. vol. 27 (suppl.) pp. 227-244, 1997.

[4] C. Orozco-Jaramillo and P. Martínez-Nieto, "Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de Pinus patula en Colombia Evaluation of inoculation with asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms isolated from rhizosphere of Pinus patula in Colombia," *BOSQUE*, vol. 30, no. 2, pp. 70–77, 2009.

[5] A. Fierros, A. Noguéz and E. Velasco. Paquetes Tecnológicos para el establecimiento de plantaciones forestales comerciales en ecosistemas de climas templados-fríos y tropicales de México. SEMARNAP. México, D.F., 1999.

[6] A. Niembro. Árboles y Arbustos Útiles de México. Limusa. México D.F., 1986.

[7] A. Corral-Lugo, Y. E. Morales-García, L. A. Pazos-Rojas, A. Ramírez-Valverde, R. Débora Martínez-Contreras, and J. Muñoz-Rojas, "Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de ' Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo ' Quantification of cultivable bacteria by the ' Massive Stamping Drop Plate ' method." Revista de divulgación Científica, Tecnológica y Humanística. Concytep, 2013.

[8] F. Ahmad, I. Ahmad, and M. S. Khan, "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities," Microbiol. Res., 2008.

[9] E. J. Poole, G. D. Bending, J. M. Whipps, and D. J. Read, "Bacteria associated with Pinus sylvestris – Lactarius rufus ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro," New Phytol., vol. 151, no. 151, pp. 743–751, 2001.

[10] G. Holguin, Y. Bashan and R. Ferrera-Cerrato, R. "Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas". Terra, vol. 14, no. 2, 1996.

[11] Ø. Hammer, DAT Harper and P. D. Ryan. "PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis". Palaeontología Electrónica, vol. 4, pp. 1-9. 2001.

[12] E. Glickmann and Y. Dessaux, "A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria," Appl. Environ. Microbiol., vol. 61, no. 2, pp. 793–796, 1995.

[13] C. L. Patten and B. R. Glick. "Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System," Appl. Environ. Microbiol., vol. 68, no. 8, pp. 3795–3801, 2002.

[14] C. Lara, L. Oviedo and A. Alemán. "Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura". Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, vol. 9, no.1, pp. 17-23, 2011.

[15] C. Lara, L. M. Esquivel-Ávila and J. L. Negrete-Peñata. "Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdova-Colombia". Biotecnología en el sector Agropecuario e Industrial, vol. 9 no. 2, pp. 114-120. 2011.

[16] A. Kushwaha, S. B. Baily, A. Maxton, and G. D. Ram. "Isolation and characterization of PGPR associated with cauliflower roots and its effect on plant growth," N Save Nat. to Surviv., vol. 8, no. 1, pp. 95–99, 2013.

[17] É. Laslo, É. György, G. Mara, É. Tamás, B. Ábrahám, and S. Lányi, "Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants," Crop Prot., 2012.

[18] E. Husen. "Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro". Indonesian Journal of Agricultural Science, vol. 4, no 1, pp. 27-31, 2003.

[19] S. C. Hsu and J. L. Lockwood, "of Actinomycetes in Water and Soil Selective Medium for Enumeration Powdered Chitin Agar as a," Appl. Microbiol, vol. 29, no. 3, 1975.

[20] G. D. Bending, E. J. Poole, J. M. Whipps, and D. J. Read, "Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris-Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root fungus interactions and plant growth," FEMS Microbiol. Ecol. vol. 39, pp. 219-227, 2002.

[21] B. R. Glick. "Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria". In: "Beneficial Plant-Bacterial Interactions". Springer International Publishing, Switzerland, pp. 1-26, 2015.

[22] B. R. Glick. "Modulating Phytohormone Levels". In: "Beneficial Plant-Bacterial Interactions". Springer International Publishing, Switzerland, pp. 65-94, 2015.

[23] C. L. Patten and B. R. Glick, "Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid". Can. J. MIcrobiol. vol. 42, pp. 207-220, 1996.

[24] [33] F. Cassán, V. Sgroy, D. Perrig, O. Masciarelli, and V. Luna. "Producción de fitohormonas por *Azospirillum sp*. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal". In: F. Cassán and I. García de Salamone (Eds.), "*Azospirillum sp*., cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina". Asociación Argentina de Microbiología, pp. 61-78, 2008.

[25] M. Lambrecht, Y. Okon, A. Vande Broek and J. Vanderleyden. "Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions". Trends Microbiol. vol. 8, pp. 298-300, 2000.

[26] H. Rodríguez and R. Fraga, "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion," Biotechnol. Adv., vol. 17, pp. 319–339, 1999.

[27] N. S. Subba Rao. "Soil Microorganisms and Plant Growth". Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, 1977.

[28] M. Lucy, E. Reed, and B. R. Glick, "Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria". Antonie van Leeuwenhoek, vol 86, pp. 1–25, 2004.

[29] G. Santoyo, G. Moreno-Hagelsieb, M. C. Orozco-Mosqueda and B. R. Glick. "Plant growth-promoting bacterial endophytes". Microbiological Research, vol.183, pp. 92–99, 2016.

[30] I. Chet and J. Inbar. "Biological control of fungal pathogens. Appl Biochem Biotechnol. vol. 48, pp. 37–43, 1994.

[31] E. Gamalero and B. R. Glick. "Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria". In: "Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management", D. K. Maheshwari (Ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 17-46, 2011.

[32] J. Frankowski, M. Lorito, F. Scala, R. Schmidt, G. Berg and H. Bahl. "Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48". Arch Microbiol, vol. 176, pp. 421–426, 2001.

[33] A. Ordentlich, Y. Elad and I. Chet, I. "The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*". Phytopathology, vol. 78, pp. 84–88, 1998.

[34] P. P. Singh, Y. C. Shin, C. S. Park and Y. R. Chung. "Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria". Phytopathology, vol. 89, pp. 92–99, 1999.

[35] Y. C. Kim, H. Jung, K. Y. Kim and S. K. Park. "An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions". Eur. J. Plant Pathol. vol. 120, pp. 373–382, 2008.

IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN RESPUESTA A LA INTERACCIÓN CON *Macrophomina phaseolina* EN *Arabidopsis thaliana*.

*Cuevas-Moreno, J.A., González-Prieto, J.M., Castríta-Domínguez, P. y Méndez-Morán, L.

*Autor para correspondencia: ibt_anCuevas@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El estudio de las bases moleculares del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* y sus hospederos es muy básico y require de un análisis más profundo. Mediante el uso de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo y técnicas de expresión diferencial, se pretende obtener genes involucrados en la interacción planta-patógen. El objetivo del trabajo fue el análisis de secuencias de cDNAS obtenidos por hibridación sustractiva de *Arabidopsis thaliana* relacionados con la respuesta a la infección por *Macrophomina phaseolina*. Se analizaron las secuencias de 117 cDNAs por homología utilizando las bases de datos en línea. Como resultado, 107 de estas etiquetas tuvieron homología con genes de *Arabidopsis,* siendo nueve de estas correspondientes a genes reportados cuya expresión se relaciona con la respuesta a la interacción con hongos fitopatógenos, principalmente de respuesta de defensa. Dos genes fueron los principales, uno que codifica para la Extensina 3 y otro para la Nitrilasa 2, ambos han sido reportados en *Arabidopsis* cuya expresión se incrementa en respuesta a la infección por *Botrytis cinera*. El uso de modelos de estudio tan importantes como *Arabidopsis thaliana* resulta conveniente para comprender los procesos patogénicos relacionados con el hongo *Macrophomina phaseolina.*

Palabras clave: Expresión; fitopatógeno; Interacción planta-patógeno; Respuesta.

REFERENCIAS

[1] Diatchenko, L; Lau, Y. C; Campbell, A. P; Chenchik, A; Moqadam, F; Huang, B; Lukyanov, S; Lukyanov, K; Gurskaya, N; Sverdlov, E; Sierbert, P; 1996. Supression subtractive hybridation: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 93. 6025-6030.

[2] Kahmann, R; Basse, C; 2001. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. Current Opinion in Microbiology. Vol. 4. 374-380.

[3] Kaur, S; Dhillon, G. S.; Bar, S. K.; Vallad, G. E.; Chand, R; Chauhan, V. B.; 2012. Emerging phytopathogen Macrophomina phaseolina: biology, economic importance and current diagnostic trends. Critical Reviews in Microbiology. 1-16.

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OXIDATIVA Y PRODUCCIÓN DE H2O2 POR *Pycnoporus sanguineus* EN INTERACCIONES INTERESPECÍFICAS CON HONGOS SAPROBIOS DE SUELO.

[1]Arámbula-Zúñiga, C.C. y *Chan-Cupul, W.

1. Universidad de Colima, Laboratorio de Control Biológico y Micología Aplicada, Km 40 Autopista Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, C.P. 28934.

*Autor para correspondencia: wchan@ucol.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Los co-cultivos fúngicos (interacciones interespecíficas) son una alternativa para incrementar biológicamente la actividad enzimática oxidativa y producción de compuestos de interés biotecnológico en hongos ligninolíticos. El objetivo de esta investigación fue determinar los tipos de interacciones fúngicas interespecíficas que existen entre *Pycnoporus sanguineus* y ocho Hongos Saprobios de Suelo (HSS). La interacción que *P. sanguineus* mayormente presentó fue la inhibición a distancia, las especies de HSS inhibidas fueron: *Beauveria brongniartii, Purpureocillium lilacinus, Penicillium hispanicum, Metarhizium anisopliae* (Ma 129 y Ma258) y *Paecilomyces carneus.* Particularmente, este tipo de interacción incrementó fuertemente la actividad lacasa y MnP en *P. sanguineus*, donde *P. lilacinus y B. brongniartii* incrementaron 28.5 y 16.2 veces más la actividad lacasa, respectivamente. Mientras que la MnP se incrementó 5.0 y 8.4 veces más por efecto de la interacción con *P. lilacinus* y *B. brongniartii*, respectivamente. En el co-cultivo en fermentación líquida entre *P. sanguineus* y *P. lilacinus*, el mejor incremento de la lacasa se encontró a las 48 h de cultivo (2.08 veces más), mientras que para la MnP, el mejor incremento se observó a las 96 h (11.27 veces más). Finalmente, durante toda la evaluación la producción de H2O2 en el sistema de co-cultivo fue mayor respecto al monocultivo, el valor más alto fue a las 24 h de co-cultivo con 0.23 mg/L, mientras que el monocultivo no presentó producción de H2O2. Las actividades enzimáticas de lacasa y MnP, y H2O2 producidas en sistemas de co-cultivo podrían emplearse para la degradación de xenobióticos en suelo y agua contaminada.

Palabras clave: Biotecnología ambiental; inducción biológica; lacasa; manganeso peroxidasa.

REFERENCIAS

[1] J. Bader, E. Mast, M. Popovic, R. Bajpai y U. Stahl, "Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology," Journal of Applied Microbiology, vol. 1, no. 2 , pp. 1-17, 2010.

[2] W. Chan-Cupul, G. Heredia-Abarca, R. Rodríguez-Vázquez, "Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions," Journal of Environmental Science and Health Part B, vol. 51, no. 5, pp. 298-308, 2016.

EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE CEPAS DE BACILLUS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Mammillaria scheidweileriana*.

[1]*Pacheco-Aguilar, J.R., [1]Chávez-Ambriz, L.A., [2]Hernández-Morales, A., [3]Cabrera-Luna, J.A. y [1]Luna-Martínez, L.

1. Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las campanas S/N, Col. Las campanas, C. P. 76010, Querétaro, México.
2. Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Fracc Rafael Curiel, C. P. 79060, San Luis Potosí, México.
3. Herbario Dr. Jerzy Rzedowski. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las campanas S/N, Col. Las campanas, C. P. 76010, Querétaro, México.

*Autor para correspondencia: juanramio29@yahoo.com.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El 60 % del territorio mexicano está constituido por zonas áridas y semiáridas que constituyen un gran ecosistema para la vegetación xerófita. Estos hábitats se han visto modificados al grado de su destrucción por las obras de vivienda, el pastoreo y el saqueo de especies endémicas. Una alternativa biotecnológica es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal para reconstruir y mantener los ecosistemas desérticos y las cactáceas que habitan en ellos. En el presente trabajo se identificaron por secuenciación del gen 16S ARNr dos cepas (P19 y P24) caracterizadas como promotoras del crecimiento vegetal pertenecientes al género Bacillus, las cuales fueron inoculadas al igual que cepa *Bacillus subtilis* en plantas de *Mammillaria scheidweileriana*, registrando semanalmente el número de flores y botones florales. El crecimiento radial se midió al inicio y 12 meses después del experimento. Los resultados obtenidos muestran que en la producción botones florales, Las plantas inoculadas con P24 tiene la máxima producción de marzo a octubre y *Bacillus subtilis* de diciembre a marzo, alcanzando en este último mes un promedio de 15.92 botones florales por planta. Respecto al número de flores en antesis, los tratamientos con *Bacillus subtilis* y P24 estimularon favorablemente la producción de flores por planta, con un máximo de producción en febrero encontrando un promedio de 10.83 y 10.17 flores por planta respectivamente, mientras que para P19 y el testigo se tenía un promedio de 8.66 y 8.74 flores. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al crecimiento radial, todos los tratamientos mostraron un incremento del 47.7 % al 52.1 % después de un año de iniciado el experimento. El presente estudio muestra que los microorganismos rizosfericos tienen efecto sobre la fisiología floral, aunque no en el crecimiento del *Mammimallaria scheidweileriana*, lo cual nos ayuda a comprender la relación planta microorganismo que guarda la ecología de la rizósfera para establecer programas de conservación de estas especies.

Palabras clave: inoculantes microbianos; ácido indolacético; antesis; zonas áridas.

REFERENCIAS

[1] Bowers, J. E. Flowering patterns and reproductive ecology of *Mammillaria grahamii (*Cactaceae), a common, small cactus in the sonoran desert. 2002. Madroño. 49 (4). 201-206.

[2] Hernandez, H., Godínez, H. Contribución al conocimiento de las cactáceas Mexicanas Amenazadas. 1994. Acta Botánica Méxicana. 26. 33-52.

[3] Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., Lopez-Mata, L., Trejo, C. Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (cactaceaea): Su significado adaptativo. 2003. Interciencia. 28 (2). 1-17.

A CO-EVOLUTIONARY APPROACH OF SERPINS AND SERINE PROTEASES USING MIRROTREE METHOD.

*Baltazar-Díaz, T.A., Brena-Becerril, A. y Vizcaíno-Rodríguez, L.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Academia de Ingeniería en Biotecnología

*Autor para correspondencia: tonatiuhabd@gmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Co-evolutionary protein analyses are supported by a variety of methods, many of them applied to verify possible interactions and functional relationships in a taxonomic context. At the molecular level, computational tools are widely used in co-evolutionary studies since its capabilities to process large amounts of data and use diverse approaches, like codon usage or amino acid substitution. Among methods based on amino acid sequences, MirrorTree method is a good approach in so far as it evaluates by means of a linear correlation, the distance of two protein families using their phylogenetic trees similarities. The interaction might be indirect, if the protein-protein pair is involved in the same pathway, and in some cases, this method could predict protein-protein interactions on a genomic scale. Generally speaking, MirrorTree method consists of finding orthologs of the two proteins in multiple species or taxa. This aligns the obtained ortholog sequences, and composes an evolutionary distance matrix from a phylogenetic tree, previously constructed from the multiple sequence alignment, or from the aligned protein pairs. Finally, a Pearson's correlation will determine the co-evolution of protein pairs and predict possible interactions. Serpins are a superfamily of proteins widely distributed among all kingdoms of life, whose members share a common tertiary structure and many of them also exhibit serine proteinase inhibition activities, by virtue of a unique mechanism. On the other hand, serpins are involved in critical biological processes by means of regulation of proteolytic activities, such as apoptosis, inflammation and other signaling pathways in higher mammals. However, the occurrence of serpins and serin proteases is not restricted to higher mammals, since they are also relevant in plants, bacteria, viruses and parasites, where serpin interaction with serin proteases seems to be involved in promoting evasion of the host's immune response. In humans, the α1-antitrypsin deficiency, notwithstanding its complexity, is the result of an imbalance of a serin protease (neutrophil elastase) and an inhibitory serpin (α1-antitrypsin). Here, we have analyzed a pool of serpin (serine protease inhibitors) sequences and a pool of serine proteases from different taxa, in order to assess the co-evolution of this protease antiprotease proteins and its functions. We have applied MirrorTree method on known interacting protease and antiprotease protein pairs, besides sets of putative interacting protein pairs and non-interacting pairs. To our knowledge, is the first time that serine proteases and serpin inhibitors co-evolution in a variety of species is assessed using MirrorTree approaches.

Palabras clave: Bioinformatics; coevolution; serpins; serine proteases

REFERENCIAS

[1] H. Zhou and E. Jakobsson, "Predicting protein-protein interaction by the mirrortree method: Possibilities and limitations," PLoS One, vol. 8, no. 12, 2013.

[2] D. de Juan, F. Pazos, and A. Valencia, "Emerging methods in protein co-evolution," Nat. Rev. Genet., vol. 14, no. 4, pp. 249–261, 2013.

[3] P. G. W. Gettins, "Serpin structure, mechanism, and function," Chem. Rev., vol. 102, no. 12, pp. 4751–4803, 2002.

DUPLICACIÓN GÉNICA EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE TAXOL EN LA PLANTA DE BANANO (*Musa acuminata*).

González-Chávez, R., y *Beltrán-García, M.

Universidad Autónoma de Guadalajara. Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres. Av. De la Patria No.1201. Lomas de Valle. CP. 45129, Zapopan, Jalisco. México.

*Autor para correspondencia: jbeltran@edu.uag.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El fruto de la planta del banano es uno de los cultivos más importantes para el consumo humano. Sin embargo, una vez que el fruto inicia su proceso de maduración aumenta la pérdida de firmeza, lo que genera grandes pérdidas económicas. Estudios recientes demuestran que durante el proceso de maduración se presentan cambios genéticos y bioquímicos que permiten la formación de un fruto sano y comestible (1,2). De forma interesante, se ha observado que en el fruto maduro se expresa 10 veces más el gene que codifica para la enzima 3-N-debenzoil-2-desoxitaxol N-benzoiltransferasa, responsable de la reacción final en la ruta de biosíntesis del taxol (1). Este diterpeno es un fármaco utilizado en quimioterapia para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de ovario, mama y pulmón, por lo que su producción es de gran importancia (3). En este estudio se presenta un análisis genómico comparativo del gene LOC103997897 con el propósito de caracterizar la ruta de biosíntesis de Taxol en la planta del banano. El análisis del genoma completo revela la presencia de múltiples copias del gene LOC103997897, indicando que este se encuentra en un proceso de evolución adaptativa por duplicación génica. Se discuten las implicaciones de estos procesos.

Palabras clave: Taxol, Musa acuminata, Duplicación génica, Cáncer.

REFERENCIAS

[1] Asif, M. H., Lakhwani, D., Pathak, S., Gupta, P., Bag, S. K., Nath, P., & Trivedi, P. K. (2014). Transcriptome analysis of ripe and unripe fruit tissue of banana identifies major metabolic networks involved in fruit ripening process. BMC plant biology, 14(1), 316

[2] Jourda, C., Cardi, C., Bocs, S., Garsmeur, O., D'Hont, A., & Yahiaoui, N. (2014).Expansion of banana (Musa acuminata) gene families involved in ethylene biosynthesis and signalling after lineage-specific whole-genome duplications. New Phytologist, 202(3), 986-1000

[3] Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Molecular Biology of the Cell, 25(18), 2677-2681

EFECTO DE *Canavalia ensiformis* INOCULADA CON MICORRIZAS Y REDUCCIÓN DEL FERTILIZANTE MINERAL EN EL CULTIVO DEL TABACO.

[1]*Garcia-Rubido, M., [2]Espinosa-Rivera, R., [1]Cruz-Hernandez, Y., [1]Acosta-Aguiar, Y. y [1]Martinez-Acosta L.

1. UCTB. Estación Experimental del Tabaco (E.E.T.), Finca Vivero, San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba.
2. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas, Mayabeque, La Habana, Cuba.

*Autor para correspondencia: investigacion6@eetsj.co.cu

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El uso de biofertilizantes constituye uno de los elementos más valiosos que puede utilizar la agricultura ecológica en los sistemas productivos como una alternativa viable y sumamente importante, para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite disminuir los costos de producción y la contaminación ambiental, además permiten conservar el suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad. En este sentido, teniendo en cuenta la necesidad de sistemas de manejos para optimizar los sistemas agrícolas de producción, se realizó el presente trabajo con el objetivo de evaluar la utilización conjunta de canavalia e inoculantes micorrizícos en la producción de tabaco negro cultivado al sol, se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, con nueve tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos estudiados fueron: Barbecho (testigo); Canavalia y Canavalia más hongos micorrízicos arbusculares en alternancia con el tabaco, cultivar "Criollo 98". En los tratamientos de barbecho y donde se sembró canavalia en ambas formas en alternancia con tabaco se evaluaron 3 dosis de fertilizante mineral (50; 75; 100 %), utilizando la fórmula completa NPK. El aporte de fitomasa y nutrimentos de canavalia fue superior al barbecho, al igual que la multiplicación de propágulos nativos de HMA en el suelo. El tabaco cuando se alternó con Canavalia y Canavalia más HMA, presentó rendimientos superiores al barbecho y con diferencias en la colonización radical por HMA en estos tratamientos. El tabaco respondió significativamente a la reducción del 25 % de la dosis de fertilizante mineral, con diferencias en los rendimientos obtenidos en el tratamiento donde se alternó con barbecho.

Palabras clave: Abono verde; fertilización mineral; cultivo.

LA SUSTENTABILIDAD AGROALIMENTARIA Y LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS ¿CAMPMONSANTO?

*Ibave-González, J.L. y Badillo-Lucero, J.

Observatorio de Medios, Política y Sociedad. Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, Universidad Autónoma de Chihuahua. Calle Henry Dunant No. 4612, Colonia Anillo Envolvente PRONAF, C.P. 32315. Ciudad Juárez, Chihuahua.

*Autor para correspondencia: ave@yahoo.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La introducción de organismos genéticamente modificados (OGM) representa un riesgo ambiental, de salud y seguridad para aquellos países que han introducido este tipo de tecnologías a la producción agroalimentaria dentro de sus sistemas económicos. Las premisas de sustentabilidad, bioseguridad, bajo costo, alto rendimiento, más nutritivos, con menos insumos para la producción y que definitivamente acabaran con la hambruna mundial, simplemente no tienen fundamento. Puestos en la balanza, existen aspectos de negatividad probados (contaminación por polinización libre de maíz transgénico a maíces nativos o criollos; resistencias por presiones a las especies de insectos resultado de OMG que producen sus propios insecticidas como Maíz CryB; transgénicos con resistencia a herbicidas que han generado especies de plantas resistentes (Maíz Roundup); introducción de resistencia a antibióticos que provocando un efecto acumulativo entre especies; por mencionar algunos), e impacto aun impredecible que los hace ser un riesgo, por lo que se tienen que realizar estudios éticos, libres de interferencias o conflictos de interés y no solo responder a los intereses de compañías transnacionales que infieren una subordinación cívica al generar sus propios estándares y regulaciones sustentadas en investigaciones financiadas por ellos mismos. La ignominia de pretender "conquistar la naturaleza" por medio de la producción ilimitada de organismos genéticamente modificados sin medir sus costos como erosión, contaminación e extinción de especies y cambio climático, es un síntoma de que la naturaleza espera su tiempo para revertirse y castigar a sus abusadores.

Palabras clave: Transgénicos, Round-Up, Inocuidad

REFERENCIAS

[1] Breckling roder, au e euter, Ulri e Middelhoff, Michael Glemnitz, ngeli a urbs, Gunther chmidt, infried chr der,and ilhelm indhorst. 2011. is indication of genetically modified organisms (GMO): Modelling environmental exposure and dispersal across different scales Oilseed rape in Northern Germany as an integrated case study. Ecological Indicators 11, 936–941.

[2] Clive, James.2012. International Service for Acquisition of Agri-Biotech Applications. Dirección de Web consultada el 08/05/2017 http://isaaa.org/resources/publications/briefs/44/pptslides/default.asp Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., and Helling, R.B. 1973. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3240-3244.

LAS ANTOCIANINAS DE TORTILLA DE MAÍZ AZUL (RAZA MIXTECO): PROTECTORAS DE DAÑO MICRONUCLEOGÉNICO.

[1]*Ramos-Ibarra, M.L., [2]Alarcón-Aparicio, E., [2]Sánchez-Arreguín, C.G., [3]Torres-Bugarín, O., [2]Gerónimo-Guzmán, R.I., [4]Chávez-Servia, J.L., [3]Zavala-Aguirre, J.L., [1]Valderrama-Cháirez, M.L., [5]Mendoza-Roaf, P.L.

1. Depto. Salud Pública, Div. Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara (UDG).
2. Universidad Veracruzana.
3. Universidad Autónoma de Guadalajara.
4. Instituto Politécnico de Oaxaca
5. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, UDG.

*Autor para correspondencia: maluisaramos@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Evaluar el efecto protector de las antocianinas contenidas en las tortillas elaboradas con maíz azul, de la raza mixteco sobre el daño micronucleogénico, se formaron 6 grupos de ratones. Grupo 1: sol/salina; Grupo 2: ciclofosfamida (CF) 5 mg/kg peso corporal; Grupo 3: CF 5 mg/kg + 20 µl de extracto de tortilla de maíz azul de la raza mixteco (ETMARM); Grupo 4: alimento convencional; Grupo 5: 0,06 g de tortilla de maíz azul de la raza mixteco (TMARM); Grupo 6: 0,6 g de TMARM. Los grupos 1-3 se les administró oralmente las soluciones vía sonda orogastrica y la CF y en los grupos 4 a 6 las dosis fueron ad llibitum. Se tomaron muestras de sangre periférica a los ratones, se realizaron frotis, se procesaron y se tiñeron con naranja de acridina. Se realizó el conteo celular (frecuencias de eritrocitos micronucleados [MNE]; Eritrocitos policromáticos micronucleados [EPCMN] y eritrocitos policromáticos [EPC] con microscopia de fluorescencia. Resultados: Los grupos 1 y 4 (controles/negativos) presentaron similitudes en la frecuencia de EMN, EPC y EPCMN a lo largo del muestreo. El grupo 2 presentó menor frecuencia de EMN debido a que hubo citotoxicidad y por ende disminución de EPCMN; mientras que los grupos 3, 5 y 6 (experimentales) mostraron disminución significativa en la frecuencia de EMN con respecto a los controles ($P<0,05$). Conclusiones: Las antocianinas contenidas en ETMARM y TMARM, tienen efecto protector sobre la inestabilidad genómica inducida por el daño micronucleogénico de la CF, ya que disminuyen la frecuencia de EMN en los ratones expuestos.

Palabras clave: Antocianinas; Tortilla; Maíz azul; Micronucleogénico

REFERENCIAS

[1] Chávez Cruz J. Francisco Moreno Salinas Yolanda, Ortiz Diaz A. Silvia, González Castillo Fernando, Granos de Maíces pigmentados de Chiapas, Características Físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico. Artículo científico. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (1): 33 - 41, 2012 pp35 38.

[2] Vera-Guzmán, Araceli M.; Chávez-Servia, J. Luis; Carrillo-Rodríguez, José C. PROTEÍNA, LISINA Y TRIPTÓFANO EN POBLACIONES NATIVAS DE MAÍZ MIXTECO Revista Fitotecnia Mexicana, vol. 35, núm. 5, septiembre, 2012, pp. 7-13 Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Chapingo, México.

[3] Alarcón Aparicio Edna. Tesis de Doctorado. 2013. Universidad Veracruzana.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE AGAVE PULQUERO.

Ávila-Torres, D.A., Meza-Carmen, V. y *Altamirano-Hernández, J.

Instituto de Investigaciones Químico – Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. C.P. 58030.

*Autor para correspondencia: josueah@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

México es considerado centro de origen del género agave, del que existen 272 especies. El agave se ha utilizado para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas como alimento, medicamento, fibras y la elaboración de bebidas alcohólicas [1]. Las especies utilizadas para la producción de pulque son Agave salmiana, A. mapisaga y A. atrovirens [2]. La planta de agave pulquero se prepara para la colecta del aguamiel, cuando esta desarrolla el escapo floral, al inicio de la maduración [3]. Muy pocos trabajos abordan el tema del desarrollo del agave, ya que se ha reportado que su maduración puede oscilar entre los 10 y 25 años. Sin embargo, para que pueda generarse una industria pulquera rentable, es necesario encontrar alternativas que disminuyan el tiempo de maduración en la planta, sin afectar la calidad del aguamiel producida [4]. En años recientes, el interés por utilizar bacterias promotoras de crecimiento en la producción de cultivos ha ido en aumento [5]. En este sentido, se han aislado diversas bacterias endófitas de plantas de Agave tequilana, las cuales han mostrado promoción de crecimiento debido a su capacidad de fijación de nitrógeno, producción de auxinas, solubilización de fosfato y por tener un efecto antagónico contra hongos fitopatógenos [6]. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal que pudieran acelerar el desarrollo de plantas de agave pulquero sin hacer uso de fertilizantes químicos. Se colectó suelo rizosférico y tejidos de agave pulquero, de las cuales se obtuvo 47 aislados. La identificación de promotores de crecimiento se realizó por tamizado (Frijol, Maíz y Arabidopsis), identificandose 6 cepas con capacidad de incrementar el desarrollo de raíces laterales, así como aumentar el número de hojas y el área foliar en estos tres modelos vegetales. Actualmente, se evalua el efecto de estas cepas en plántulas de agave, a través de parámetros morfológicos y bioquímicos.

Palabras clave: Desarrollo; Maduración; Aguamiel; Calidad.

REFERENCIAS

[1] Rzedowski R. J., R. G. Calderón (1990) Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología. Michoacán, México. 394 p.

[2] Ramírez, V. P., R. O. Pascka., A. L. Herrera., F. Castillo., M. Livera., F. Rincón., F. Zavala (2000) Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura. Informe Nacional. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. pp:1-100

[3] Escalante, A., López Soto, D., Velazquez-Gutierrez, J., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., López-Munguía, A. (2016) Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. Frontiers in Microbiology. 7: 1026. doi: 10.3389.

[4 García Mendoza, A.J. (2007). Los agaves de México. Universidad Nacional autónoma de México. México. pp 14-23.

[5] Díaz Vargas y col. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Instituto de Recursos Naturales. Montecillo, México. pp 327-335.

[6] Martínez-Rodríguez y col. (2014). Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of Agave tequilana and their role as plant growth promoters. Brazilian Journal of Microbiology 45:4, pp 1333-1339.

PRODUCCIÓN DE SEMILLA SINTÉTICA DE *Mammillaria coahuilensis* (BOED) Y *Mammillaria carmenae* (CASTAÑEDA).

*García-Osuna, H.T. Ramírez-Godina, F., y Torres-Tapia, M.A.

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

*Autor para correspondencia: hgosuna@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El uso de la tecnología de semilla artificial para el rescate y la conservación de cactáceas aún no ha sido desarrollado, sin embargo, se cuenta con el protocolo para su propagación por la ruta de la embriogénesis somática, organogénesis directa e indirecta que permite su propagación masiva y la obtención de material ideal para la encapsulación. La encapsulación tecnológica reduce el costo de micropropagación de plantas y también ha sido empleada para almacenar a corto y largo plazo. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue establecer el protocolo para la producción de semilla sintética de dos especies de cactáceas: *Mammilaria coahuilensis* y *M. carmenae.* Se partió de embriones somáticos establecidos en medio MS adicionado con 0.5 mg L-1 de ácido giberélico más 2 mg L-1 de BAP y 0.5 mg L-1 de ANA. La semilla sintética se obtuvo por encapsulación en gel, adicionada con 3% de sacarosa más 3% de alginato de sodio y 100 µm de cloruro de calcio. Las cápsulas se almacenaron a 4ºC por 60 días, se observó una sobrevivencia del 97%. La semilla sintética recuperada fue morfológicamente idéntica a la planta madre.

Palabras clave: semillas sintética; cactáceas; alginato; *mammillaria coahuilensis; mammillaria carmenae.*

INTRODUCCIÓN

La tecnología de las semillas sintéticas ha demostrado ser una estrategia viable para la conservación del germoplasma de plantas, y puede tener múltiples aplicaciones tanto científicas como industriales, permitiendo el manejo de los recursos naturales de forma sustentable. Dentro de las ventajas de la aplicación de esta tecnología se encuentra el mantener la uniformidad genética, almacenamiento por largos períodos, eliminación de la etapa final de la micropropagación (por ejemplo enraizamiento y aclimatización) permitiendo la entrega directa así como el desarrollo de sistemas de propagación rentables[1].

Las semillas sintéticas consisten en propágulos somáticos (yemas axilares, embriones somáticos, brotes u otros propágulos de desarrollo in vitro) capaz de conversión a plántulas en condiciones *in vitro* o *ex vitro*.

La aplicación de esta tecnología para la conservación de los miembros de familia Cactaceae no ha sido anteriormente propuesta.

Esta familia es originaria del Continente Americano, agrupa a cerca de 2000 especies, las cuales han logrado adaptarse a los climas desérticos. México es el país con mayor riqueza de estas plantas, con 913 taxones, de los cuales el 80 por ciento son endémicos del país.

Tan solo la norma oficial emitida por la SEMARNAT en el 2010[2], incluye 275 especies de cactáceas en alguna categoría de protección, 92.3% son endémicas, donde la extracción ilegal de sus hábitats naturales es el problema fundamental de la disminución de las poblaciones de la familia Cactaceae. Otro factor es el cambio de uso de suelo.

Estas amenazas han mermado las poblaciones de dos especies incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010: *Mammillaria coahuilensis y M. carmenae.* La primera es una especie amenazada y la segunda se encuentra en la categoría de peligro de extinción (P).

México es el centro más importante del mundo en concentración de cactáceas. Los cactólogos reconocen la existencia de 913 taxones, conformando 669 especies, las cuales se encuentran agrupadas en 63 géneros, y se reconocen 244 subespecies. El estado de San Luis Potosí es el que posee una mayor diversidad, con un registro de 151 especies. Le siguen los estados de Coahuila con 126 especies y Nuevo León y Oaxaca con 118 especies cada uno. San Luis Potosí también es el estado con mayor riqueza de géneros (33), seguido por Oaxaca con (32) y Tamaulipas (31) [3].

El género *Mammillaria* es probablemente el género más rico en especies y morfológicamente variable en las cactáceas. El origen en su mayoría provienen de México aunque algunas son nativas del sudeste de Estados Unidos, el Caribe, América Central y de la parte norte de América del Sur. Este genero presenta mayor sobreexplotación comercial[4].

El uso de la tecnología de semilla artificial para el rescate y la conservación de *cactáceas* aún no ha sido desarrollado, sin embargo, se cuenta con el protocolo para su propagación por la ruta de la embriogénesis somática, organogénesis directa e indirecta[5,6] que permite su propagación masiva y la obtención de material ideal para la encapsulación.

La encapsulación tecnológica reduce el costo de micropropagación de plantas y también ha sido empleada para almacenar a corto y largo plazo. La semilla sintética (semillas artificiales o semillas somáticas son análogas a las verdaderas o semillas botánicas y consisten en cubrir embriones somáticos, plántulas, meristemos, etc., con capas formando una cápsula [1,6,7,8,9]. Éstas tienen múltiples ventajas como: uniformidad en la producción alta capacidad de sobre-escalonamiento, potencial para automatización de producción, fácil manejo en el transporte y almacenamiento de germoplasma de élite, o en peligro de extinción [10,11,12].

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó al cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Material vegetal

Se utilizó embriones somáticos de *Mammillaria coahuilensis* y *M. carmenae.*

Establecimiento del cultivo

Se partío de la siembra de embriones cigóticos para la iniciación de callo y posterior establecimiento y formación de embriones somáticos en medio de cultivo MS adicionado con 0.5 mg L^1 de ácido giberélico más 2 mg L^1 de BAP y 0.5 mg L^1 de ANA.

Matriz de encapsulación

Para la encapsulación de los embriones somáticos se utilizó una matriz que contenía alginato de sodio en complejo de cloruro de calcio. Las soluciones fueron preparadas como se describe a continuación:

a) Alginato de sodio en concentraciones de 2, 3 y 4% disuelto en solución de medio MS sin cloruro de calcio

b) Cloruro de calcio a concentraciones de 75, 100 y 125 µM disuelto en soluciones de sales MS.

Proceso de encapsulación

Los embriones somáticos fueron disectados y colocados en cajas petri bajo condiciones de asepsia se suspendieron embriones somáticos para cada concentración de alginato de sodio posteriormente se depositaron en las soluciónes de cloruro de calcio de forma individual contenidas en matraz erlenmeyer de 250 ml. Los matraces se colocaron en un agitador rotatorio a 150 rpm por 20 m. Finalmente se decantó la solución de cloruro de calcio y las esferas se lavaron por tres ocasiones con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en frascos tipo gerber estériles y se sellaron. Las condiciones de incubación fueron a 4 ºC por 60 días.

A los 60 días las semillas fueron sembradas en medio MS sin reguladores de crecimiento para su desarrollo a plántula. Se evaluó el porcentaje de germinación después de 4 semanas de cultivo.

Aclimatización

Las plántulas fueron transferidas a macetas conteniendo peat-moss:perlita (1:1) y humedecidas con MS a mitad de su concentración. Se evaluó el porciento de sobrevivencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de alginato de sodio y cloruro de calcio en la germinación

La encapsulación con alginato fue un procedimiento eficiente para la producción de semilla sintética de *M. coahuilensis* y *M. carmenae.* El tratamiento óptimo se encontró en la concentración al 3% de alginato con 100µM de $CaCl_2$ en ambas especies.

Un bajo porciento de germinación se encontró en el tratamiento de alginato a una concentración de 4% combinado con las tres concentraciones de cloruro de calcio en *M. carmenae* (Tabla 1). En cambio en *M. coahuilensis* no se se observó diferencia significativa en ninguno de los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 1. Respuesta de *M. carmenae* a los tratamientos de encapsulación con alginato de sodio y Ca Cl_2.

Tratamiento	Alginato de sodio	$CaCl_2$µM	%Germinación	%Sobrevivencia	Oxidación	Firmeza
1	2%	75	80b	0.85b		+
2		100	85b	0.80b		+++
3		125	75b	0.80b	++	++
4	3%	75	85b	0.80b		++

5		100	100a	0.97a		++
6		125	95a	0.95b	++	++
7	4%	75	45c	0.75b		+++
8		100	45c	0.70b	++	+++
9		125	35c	0.75b	+++	+++

Tabla 2. Respuesta de *M. coahuilensis* a los tratamientos de encapsulación con alginato de sodio y Ca Cl_2.

Tratamientos	Alginato de sodio	$CaCl_2$µM	% de Germinación	% Sobrevivencia	Oxidación	Firmeza
1	2%	75	9	90		+
2		100	95	90		++
3		125	90	95	++	++
4	3%	75	95	95		+
5		100	100	100		+++
6		125	95	95	+++	+++
7	4%	75	90	90		++
8		100	90	90		++
9		125	90	90	+++	+++

La optimización en el proceso de encapsulación ha dado diferentes resultados en variadas especies [7,8,9].

Dentro de los factores que participan en la germinación de embriones somáticos se encuentran: la etapa de madurez del embrión, la oxigenación dentro de la cápsula de alginato, además altas concentraciones y tiempo de exposición prolongado al cloruro de calcio puede generar una inhibición del crecimiento que se refleja en una disminución en la respuesta germinativa del embrión[13,14].

CONCLUSIONES

Se logró determinar las concentraciones óptimas del complejo alginato-cloruro de calcio para la conservación de germoplasma. La concentración de 3% de alginato con 100 µM de cloruro de calcio y 3% de sacarosa logró la reconversión del 97% de embriones después de 60 días de almacenamiento a 4ºC para *M. coahuilensis.* Para *M. carmenae* el porcentaje de germinación fue de 86% en las mismas concentraciones.

REFERENCIAS

[1] A.K. Singh, "Plant regeneration from alginate encapsulated shoot tips of Phyllanthus amarus Schum and Thonn, a medicinally important plant species", In Vitro Cell Develoment Biology Plant, Vol 42, pp.109-113, 2006.

[2] SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-ECOL-2010. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y

fauna silvestre, Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación (Segunda sección: 6 de marzo): 1-78.

[3] U. Guzmán, S. Arias y P. Dávila. "Catálogo de cactáceas mexicanas". CONABIO, UNAM. México, D.F. 2003.

[4] P. I. Angulo –Bejarano, y O. Paredes -López "Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (Opuntia ficus-indica (L.) Mill)", Scientia Horticulturae. Vol.128, pp. 283-288, 2011.

[5] A.A., Estrada-Luna, A.A., Arrellano-Perusquia, , M.C.G., López-Peralta and F. Chablé-Moreno, "Effect of Regulators on the Organogenesis and Multiplication of Ortocactus macdougallii Alexander", Propagation of Ornamental Plants, vol 13 no. 4, pp. 160-167, 2013.

[6] N.,Y. Nieves, , R. Zambrano, M.,Tapi, D. Cid, Pina and R. Castillo, "Field Performance of Artificial Seed-Derived Sugarcane Plant", Plant Cell Tissue and Organ Culture, vol. 75, no.3, pp. 279-282, 2003.

[7] G. C.,Cangahuala-Inocente, L.L. Dal Vesco, D, Steinmacher A. C,Torrees M.P., Guerra "Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (Acca sellowiana (Berg) Biuret). Induction, conversion and synthetic sedes", Science Horticulturae vol,111, pp. 228-234, 2007.

[8] R., Poobathy, H., Nair, and S. Subramainam, "Optimisation of Encapsulation-dehydratation protocol for the orchid Hybrid Ascocenda "Princess Mikasa", Advances in Enviromental Biology, vol.3, no.1, pp. 69-83, 2009.

[9] R., Dhir and G.S. Shekhawat, "Production, storability and morphogenic response of alginate encapsulated axillary meristems and genetic fidelity evaluation of in vitro regenerated Ceropegia bulbosa: A pharmaceutically important threatened plant species.",Industrial Crop and Products , vol. 47, pp.139-144, 2013.

[10] B.,Singh, S, Sharmaand G. Rani, "In vitro response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of Kinnow mandarin (Citrus nobilis Lour x C. Deliciosa Tenora)", Plant Biotechnology Repository , vol.1, pp.101-107, 2007.

[11] R. ,Mallón, P., Barros, P. Luzardo, and M.L.,Gónzalez, "Encapsulation of moss buds: an efficient method for the in vitro conservation and regeneration of the endangered moss Splachnum ampullaceum", Plant Cell Tissue Organ Culture, v.88, pp.41-49, 2007.

[12] M., Maqsood, A. Mujib and M. Khusrau, "Preparation and low Temperature Short-term Storage for Synthetic of Caladium bicolor", Notulae Scientia Biolgicae, vol.7 no.1, pp. 2067-3264.,2015.

[13] K., Redenbaugh, B.D. Paasch, J.W. Nichol, M.E. Kossler, P.R Viss, and K.A Walker. "Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos" Bio-Technol, vol.4, pp.797-801,1986.

[14] E., Jiménez, y E. Quiala "Semilla artificial." p. 225- 240. In J.N. Pérez (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. 1998.

EVALUACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS NATIVAS Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO, COMO BIO-CONSERVADORES, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS, DURANTE LA MADURACIÓN DE UN CHORIZO MEXICANO.

[1,3*]Rebolledo-Alarcón, M.A, [2]Carmona-Escutia, R.P., [2]Villanueva-Rodríguez, S., y [3]García-Parra M.D.

1. Instituto Tecnológico de Acapulco (ITA) Carr. Cayaco Puerto Marqués s/n, Del PRI, El Coloso, Acapulco, Gro. 39905.
2. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), Unidad de Tecnología Alimentaria. Av. Normalistas #800 Colinas de la Normal. 44270.
3. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), Unidad de Tecnología Alimentaria. Camino Arenero 1227, El Bajio del Arenal, Zapopan, Jal. 45019.

*Autor para correspondencia: miguel_15_423@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Se evalúo la utilización de *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus curvatus* y aceite esencial de orégano (*Lippia graveolen*), como bio-conservadores, sobre la producción de aminas biogénicas (Cadaverina, Putrescina, Tiramina *y* Triptamina), durante la maduración de un chorizo mexicano. Se produjeron tres lotes diferentes de chorizo, un lote LQ con conservadores químicos (*benzoato de sodio* y *sorbato de potasio*), un lote dos LM con una mezcla de bacterias acido lácticas nativas (*L. plantarum y L. curvatus*) y el ultimo lote LO con aceite esencial de orégano; para cada una de las muestras se llevó a cabo la extracción, derivatización, concentración de la fase acuosa y se cuantificaron las aminas por HPLC. De esta manera se observó que para la Triptamina no se detectaron concentraciones en ninguno de los lotes durante el tiempo muestreado, para Tiramina el lote LM y el lote LQ presentaron valores similares de 270 mg/k a los 33 días, a diferencia del lote LO que tuvo una concentración superior para esta amina de 311 mg/k; con respecto a la Putrecina y Cadaverina el lote LO presentó resultados semejantes al LQ. En conclusión se observó que el tratamiento con aceite esencial de orégano LO, es el tratamiento más efectivo para reducir las concentraciones de Putrescina y Tiramina comportándose aún mejor que el antimicrobiano químico LQ.

Palabras clave: Aminas biogénicas; Bio-conservadores; Chorizo; bacterias lácticas; aceite esencial de orégano

INTRODUCCIÓN

Las aminas biogénicas son compuestos formados debido a la descarboxilación de aminoácidos o por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas que se encuentran en los alimentos por la acción de enzimas generadas mediante microorganismos. Entre las aminas biogénicas más significativas están: cadaverina, putrescina, tiramina y triptamina.

Las razones por las que la industria le toma mucha importancia son porque la ingestión de una gran concentración de estos compuestos puede provocar un cuadro tóxico en las personas y causar malestares como dolores de cabeza, migraña, nauseas, hipertensión, adormecimiento y hormigueo de los labios, pulso rápido y vomito e incluso la muerte. Otra de las razones es que ciertas aminas biogénicas se han visto implicadas en la formación de nitrosaminas carcinógenas, por otro lado, la variación en los niveles de aminas biogénicas se ha sugerido como un indicador químico útil de la calidad y la descomposición de los alimentos.

Los factores que influyen en la formación de aminas biogénicas en alimentos incluyen la disponibilidad de aminoácidos libres y la presencia de microorganismos que pueden descarboxilarlos, así como las condiciones favorables para que dichos microorganismos se multipliquen y produzcan sus enzimas. Los aminoácidos-decarboxilasas presentan una alta incidencia especialmente en ciertas especies de Enterobacteriaceae, Clostridium, Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus y Pseudomonas.[1]

Algunos autores sugieren límites para las aminas biogénicas como Silla Santos [2] y Halász y col.[3] que indican 100-800mg/kg de tiramina.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible sustitución de un conservador químico (mezcla comercial de *benzoato de sodio* y *sorbato de potasio*), analizando dos bioconservadores, una mezcla de dos bacterias acido lácticas (*L. plantarum* y *L. curvatus*) y aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolen);* se evaluó la generación de aminas biogénicas (cadaverina, putrescina, tiramina *y* triptamina), como indicadores de descomposición de productos cárnicos, durante la maduración del chorizo (33 días).

MATERIALES Y METODOS

Producción de muestras de chorizo

Previamente antes de empezar la realización del chorizo se guardó la carne y la grasa por 72 horas en un refrigerador a una temperatura de 4°C.

Pasando las 72 horas de refrigeración de la carne y la grasa, se comenzó con la molienda de la carne y grasa a través de un molino para realizar carne molida, una vez obtenida la carne molida se agregó la sal, la sal cura, glucosa, ascorbato de sodio con 420 ml de agua.

Posteriormente a la carne se le agregó pimiento, pimienta, ajo, y 360 ml de agua, y se mezcló, se dividió en 3 lotes de 6 kg cada uno, esto para realizar por separado la mezcla final de cada lote (*L. curvatus* + *L. plantarum* y aceite esencial de orégano).

Para realizar el lote control que conlleva el antimicrobiano como conservador químico (*benzoato de sodio y sorbato de potasio*), se mezclaron 120 ml de agua purificada junto con el antimicrobiano y posteriormente se mezcló con la pasta de chorizo.

Para formar el lote *L. curvatus* + *L. plantarum*, se tomaron 30 ml de caldo MRS inoculado, con una concentración de $1x10^9$ UFC/ml, esto por cada una de las cepas, posteriormente fueron centrifugados los 30 ml de caldo MRS para obtener el botón celular, se lavaron las células dos veces, el sedimento se

mezcló con 120 ml de agua purificada y lo siguiente fue mezclarlo con la pasta de chorizo. Este lote se mencionara solamente como mezcla de aquí en adelante.

En la formación del lote de aceite de orégano, se mezcló 120 ml de agua purificada con 6 gr de aceite esencial de orégano y se incorporó con la pasta de chorizo.

Todos los lotes, se dejaron reposar en bolsas por 24 horas a 4 °C; posteriormente se embutió cada uno de los lotes (Conservador químico, *L. plantarum* + *L. curvatus*, y aceite de orégano), una vez que el producto esta embutido se le realizaron divisiones aproximadamente de 5 cm de longitud.

Maduración chorizo
Se almacenaron los 3 lotes en una cámara de maduración durante un tiempo de 33 días, los muestreos se tomarón en el siguiente orden: 0, 5, 19 y 33 días se mantuvo una temperatura de 6-8°C del día 0 al día 5 y del día 6 al día 33 la temperatura mantenida fue de 10-12 °C.

Extracción de aminas biogénicas
A 5 g de chorizo sin tripa se molió en pequeños trozos después se adicionaron 10 mL de una solución de ácido tricloroácetico (TCl) al 5 % (10 mg/L de 1,7-diamonoheptano, que es el estándar interno), posteriormente se homogenizó.

Se centrifugó a 10000 *rpm* durante 20 min a 4 ºC. Se filtró en papel Whatman No. 4 y el filtrado se pasó a un matraz de 25 mL, al residuo se agregó 10 mL de TCl, y se centrifugo a 10000rpm. Se filtró el sobrenadante en papel Whatman 54 y se aforó a 25 mL con (TCl), a cada una de las muestras de chorizo.

Una vez teniendo ya la extracción de la muestra se almaceno en congelación a -20°C para después continuar con el proceso de derivatización.

Derivatización
Se utilizó la metodología propuesta por DeMey et al. 2012, con algunas modificaciones propuestas por Smelá et al. 2003. Se tomaron 50 µL para los estándares o 1 mL de la muestra, se adicionaron 150 µL de hidróxido de sodio (NaOH) 2N (ajustar hasta pH 11.5), 150 µL de solución saturada de $CaCO_3$ (5g/50mL) y 1 mL de cloruro de dansilo (5 mg/ml en acetona) y mezclar por 1 minuto en vortex. El proceso de derivatización se realizó en incubadora a 35-40 ºC por 1 hora y media. Posteriormente se detuvo la reacción adicionando 200 µL de hidróxido de amonio (300g/L), agitar por 1 minuto en vortex para quitar el exceso de cloruro de dansilo se incubó por 30 minutos en cuarto obscuro.

Para extraer la amina a la solución anterior se agregaron 2 mL de dietil éter y se agitó en vortex por 1 minuto, posteriormente se volvieron agregar 2 mL de dietil éter y se agitó 1 minuto en vortex. A continuación se dejó reposar la muestra algunos minutos para separar la fase acuosa y orgánica. La fase orgánica (parte superior) fue separada con una pipeta pasteur especial para cada muestra y colocada en vaso de precipitado de 50ml, a continuación se evaporó el disolvente en un baño maría controlando la temperatura a 40°C. El residuo obtenido fue disuelto en 3mL de acetonitrilo, pasándolo

después a un matraz aforado de 5 mL completando el aforo con acetonitrilo. Posteriormente se filtró en (membrana de nylon de 0.45 µm) y se guardaron en congelación -40°c para después ser inyectadas en HPLC.

Se utilizó un HPLC marca Varian con una columna Luna LC column Phenomenex C18(2) 100Å de 5µm 250 X 4.6mm.

Condiciones del cromatógrafo

La temperatura de inyección fue de 20°C, con un flujo de 0.8 mL/min, y un gradiente que se muestra en la tabla 1.

Se usaron acetonitrilo como fase móvil y agua grado HPLC para el enjuague del inyector de en una proporción 60-40.

El acetonitrilo que se utilizó como fase móvil y el agua a utilizar en HPLC fueron filtrados en filtros de membrana de nylon 0.45 µm.

Tabla 1. Componentes del cromatógrafo.

Módulo	Marca	Modelo	No. de serie
AUTOMUESTREADOR	Varian	ProStar 430	70135
BOMBA	Varian	ProStar 230	1642
HORNO	Varian	ProStar 510	70044
IR	Varian	ProStar 355	1070138
UV	Varian	ProStar 325	EL07039071

Tabla 2. Condiciones de HPLC

Tiempo	Acetonitrilo	Agua
0	65	35
5	70	30
20	100	0
25	65	35

Diseño de experimetos

Se utilizó un arreglo multifactorial de 4X3 con dos repeticiones. Todos los tratamientos fueron analizados usando el software XLstat versión 2016, 18.07. Se realizaron 24 tratamientos llevando a cabo un análisis de varianza con un valor de confianza de 95%. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Duncan para determinar las diferencias entre tratamientos y el tiempo.

Tabla 3. Diseño de experimentos

Factores	Niveles	Variables Respuesta

TRATAMIENTO	Control (Conservador químico) Mezcla (*L. plantarum+ L. curvatus* en proporción 1-1 1x10^9 UFC/ml) AC. Orégano 0.1%	Cuantificación aminas biogénicas (mg/k) Cadaverina Putrescina Tiramina Triptamina
TIEMPO (días)	0 6 19 33	

Todas las muestras experimentales fueron realizadas por duplicado a continuación se especifica el número de tratamientos:

No. de tratamientos= Factores X No. De niveles de cada factor.

No. De tratamientos = 4x3 = 12 tratamientos

N= 2 repeticiones

No. De muestras experimentales = 24.

Tabla 4. Promedio de la concentración de aminas de cada tratamientos en mg/kg.

Aminas	Tratamientos	Días de Maduración del Chorizo 0	6	19	33
Cadaverina	Oregano	65.5 ± 0.5^{aD}	247.3 ± 2.5^{aC}	486.6 ± 118.2^{aB}	752.1 ± 109.45^{aA}
	Anti Micro.	65.7 ± 2.6^{bD}	65.9 ± 3.1^{bD}	93.9 ± 4.2^{bD}	100.3 ± 7.5^{bD}
	Mezcla	97.0 ± 8.0^{cD}	346.3 ± 83.7^{cC}	714.7 ± 3.3^{cA}	652.2 ± 11.8^{cA}
Putrecina	Oregano	23.2 ± 0.5^{aE}	34.1 ± 1.3^{aE}	388.1 ± 28.5^{aD}	732.4 ± 66.5^{aBC}
	Anti Micro.	28.1 ± 0.7^{bE}	32.8 ± 12.3^{bE}	845.3 ± 259.1^{bBC}	670.1 ± 7.6^{bC}
	Mezcla	31.2 ± 3.0^{cE}	45.5 ± 5.9^{cE}	897.6 ± 22.7^{cB}	1521.2 ± 45.8^{cA}
Tiramina	Oregano	22.3 ± 1.8^{aF}	111.6 ± 0.1^{aDE}	254.8 ± 48.2^{aC}	448.3 ± 86.6^{aAB}
	Anti Micro.	55.2 ± 1.1^{aEF}	83.8 ± 55.7^{aDEF}	368.7 ± 7.6^{aB}	262.2 ± 24.0^{aC}
	Mezcla	111.7 ± 7.7^{bDE}	152.6 ± 44.5^{bD}	489.8 ± 30.1^{bA}	271.5 ± 8.7^{bC}
Triptamina	Oregano	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Anti Micro.	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Mezcla	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

a= diferencias entre los tratamientos; A= diferencias entre tiempo-tratamientos.

El análisis de varianza para la cadaverina mostró que existe diferencia estadísticamente significativa en el tiempo y entre tratamientos como en la interacción tratamiento-tiempo, en la Figura 1, es evidente que tanto la mezcla como el orégano ambos tienen diferencia estadísticamente significativa con respecto al antimicrobiano al día 19 y al día 33, con respecto al tiempo el análisis nos indica que también existe diferencia estadísticamente significativa por lo que el efecto que se observa también va a

depender del tiempo. Se observa también en la Figura 1 que el antimicrobiano fue el que presento la menor producción de cadaverina durante toda la maduración del chorizo.

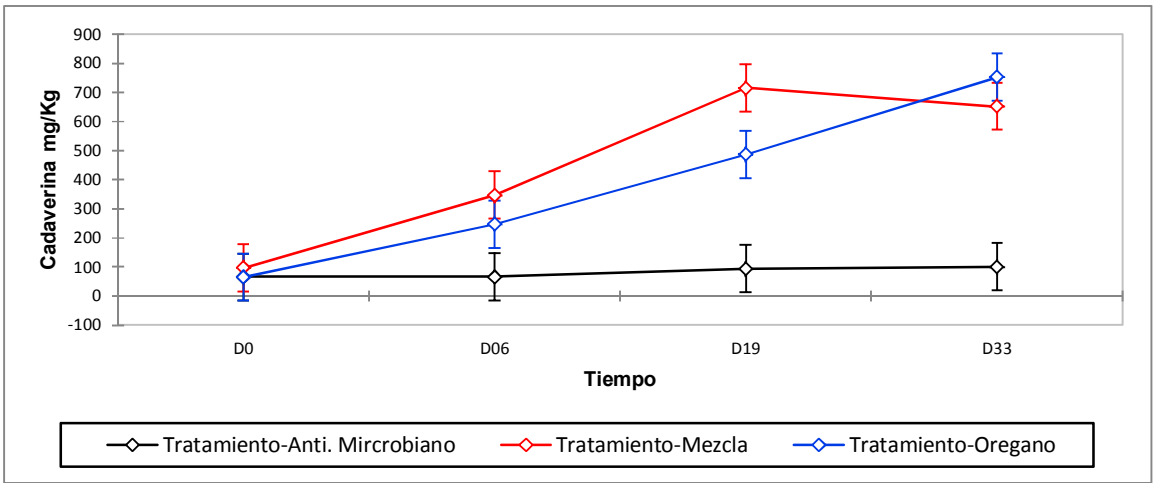


Figura 1. Grafica de diferencia de medias de interacción tiempo-tratamiento de cadaverina

El análisis de varianza para la putrescina mostró que existe diferencia estadísticamente significativa para los tratamientos con respecto al tiempo y de igual manera para la interacción tiempo-tratamientos, en la gráfica 2 se puede observar que en los días 0 al día 6 no existe diferencia estadísticamente significativa, se observa también que la mezcla con respecto al antimicrobiano en el día 19 no presenta diferencia estadísticamente significativa al igual que tampoco la hay del lote de orégano con respecto al anti microbiano en el día 33, en la gráfica 2 se observa que al día 33 la mezcla fue la que genero mayor concentración de putrescina.

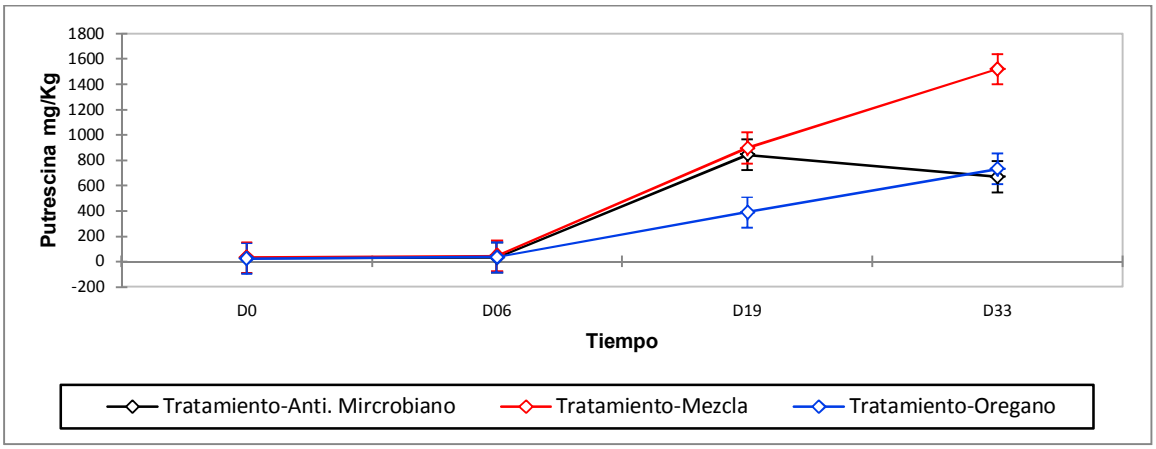


Figura 2. Grafica de diferencia de medias de interacción tiempo-tratamiento de putrescina.

El análisis de varianza determino que para la tiramira existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, como también la hay con respecto al tiempo, de igual manera para la interacción tiempo-tratamiento, en la gráfica 2 se observa que del día 0 al día 6 no existe diferencia estadísticamente significativa por lo cual la concentración de tiramira se mantiene constante esos días, sin embargo en el día 33 para el orégano existe diferencia estadísticamente significativa con respeto a los otros dos tratamientos. Se observa también en la gráfica 2 que al día 19 existe una menor concentración de tiramina con el orégano en comparación con el antimicrobiano, por otro lado se observa que la mezcla género una mayor concentración de tiramira al día 19.

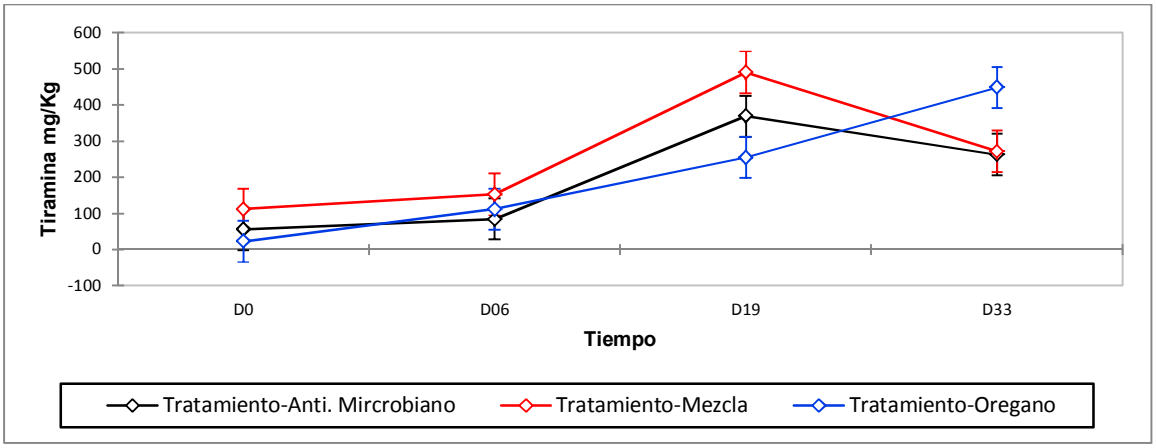


Figura 3. Grafica de diferencia de medias de interacción tiempo-tratamiento de tiramina

Triptamina

Para la triptamina no se detectaron concentraciones en ninguno de los tratamientos, en relación con bibliografía los valores de triptamina en chorizo suelen ser los que se encuentran en menores concentraciones en comparación a las otras aminas, en ocasiones incluso nulos.

DISCUSIÓN

Las concentraciones de cadaverina no se vieron disminuidas en ninguno de los tratamientos en comparación del antimicrobiano que mantiene concentraciones de cadaverina muy bajas para todos los tiempos.

En cambio las concentraciones de putrescina disminuyen al día 19 usando orégano como tratamiento incluso por debajo de los niveles que presenta el antimicrobiano. Durante el día 33 el tratamiento con orégano presenta casi los mismos niveles que el antimicrobiano.

Para la tiramira el orégano reduce nuevamente las concentraciones de esta amina al día 19 en comparación con el antimicrobiano. Para el día 33 las concentraciones para el tratamiento con orégano aumentaron por arriba del anti microbiano y la mezcla comportándose de la misma manera estos dos tratamientos en este tiempo.

Con respecto a la triptamina no se detectaron concentraciones en ninguno de los tratamientos.

Anterior mente se han analizado aminas biogénicas y su efecto en productos crudos y fermentados, utilizando bacterias acido lácticas para disminuir la carga microbiana, en este caso nos centramos en la formación de aminas biogénicas y su efecto usando como tratamientos la mezcla de bacterias acido lácticas y aceite esencial de orégano. Durante este trabajo se logró observar en los resultados que el tratamiento con el orégano no tiene un efecto significativo en la cadaverina pero a los 19 días de maduración resulta ser el tratamiento más efectivo para reducir las concentraciones de putrescina y tiramina comportándose aún mejor que el antimicrobiano. Para el día 33 el tratamiento que tiene un mejor efecto es la mezcla ya que se comporta igual al antimicrobiano.

Para determinar con exactitud si el tratamiento con orégano o el de la mezcla pueden ser sustituibles para los conservadores químicos en el chorizo, aun faltarían más estudios que nos revelen si las cuestiones organolépticas cambian y estudios también sensoriales para conocer el agrado de los consumidores. Sin embargo los resultados obtenidos pueden darnos una pauta para ser considerados y así tomarlos como una opción en la búsqueda de la sustitución de los llamados conservadores químicos que han sido asociados con el incremento de cáncer en el consumo de productos cárnicos y embutidos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos el orégano no tiene un efecto significativo en la cadaverina pero a los 19 días de maduración resulta ser el tratamiento más efectivo para reducir las concentraciones de putrescina y tiramina comportándose aún mejor que el antimicrobiano. Para el día 33 el tratamiento que tiene un mejor efecto es la mezcla de bacterias lácticas con resultados similares al antimicrobiano. Por lo que la mezcla de bacterias lácticas y el aceite esencial de orégano pueden ser una buena opción en la búsqueda de la sustitución de los llamados conservadores químicos que han sido asociados con el incremento de cáncer en el consumo de productos cárnicos y embutidos.

Faltaría realizar evaluación sensorial de estos productos para evaluar la aceptación del consumidor.

REFERENCIAS

[1] Baraggio, Nancy G, Velázquez, Natalia S, & Simonetta, Arturo C. (2010, junio). Aminas biógenas generadas por cepas bacterianas provenientes dealimentos lácteos y cárnicos. *Revista de Ciencia y Tecnología*. [Online]. (13), 1-11. Available: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872010000100012&lng=es&tlng=es.

[2] Santos, M. S. (1996, abril). Biogenic amines: their importance in foods. *International journal of food microbiology*. [Online]. *29*(2), 213-231. Available: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160595000321

[3] Halász A. *et al.(1994, Febrero)* Biogenic amines and their production by microorganisms in foods. *Trends in Food Science & Technology*. [Online] 5(2), 42-49. Available: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0924224494900701

[4] Signorini, M. L., & Guerrero-Legarreta, I. (2009, Abril). Producción de aminas biogénicas en carne de bovino conservada con ácido láctico de origen químico y bacteriano. Revista mexicana de ingeniería química. [Online]. 8(1), 41-49 Available: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382009000100004

[5] Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M. L., Garriga, M., & Vidal-Carou, M. C. (2005). Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control. *Eurocarne*: La revista internacional del sector cárnico. [Online]. (141), 1-6. Available: http://www1.clermont.inra.fr/tradisausage/Publi/Spain/Eurocarne%20141.pdf

[6] Elizari Reta, I. (2013, septiembre). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de orégano y tomillo incorporados en soluciones formadoras de films sobre la microbiota superficial de filetes de merluza. Academica-e. [Online]. 1-63 Available: http://hdl.handle.net/2454/8746

[7] Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A. & Pedro, L. G. (2005, Septiembre). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from Thymbra capitata L.(Cav.) and Origanum vulgare. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [Online]. *53*(21), 8162-8168. Available: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0510079

CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS DERIVADAS DE TRAMETES VERSICOLOR UTILIZANDO UN COPOLÍMERO DE ACRILAMIDA Y ACRILATO DE POTASIO.

*Vargas-Romero, M.C., Saldaña-Robles, A., Gomez-Luna, B.E. y Ruiz-Aguilar, G.M.L.

Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca

*Autor para correspondencia: monicacvargasr@gmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Se ha demostrado que las enzimas ligninolíticas de los hongos de la pudrición blanca son por si solas capaces de realizar la degradación de una gran variedad de sustancias recalcitrantes y tienen un mayor rendimiento cuando dichas enzimas se encuentran encapsuladas, esto se debe a que el encapsulamiento le confiere cierta protección, manteniendo la actividad y aumentando el aprovechamiento. Esto es importante cuando se pretende hacer uso de estas enzimas en condiciones poco favorables para el hongo, pero condiciones donde la enzima aún puede llevar acabo su actividad. La acción de las enzimas ligninolíticas es de especial interés debido a que son de baja especificidad y en el caso de algunos hongos ligninolíticos son extracelulares [2]. No obstante aunque existen muchas técnicas de inmovilización de enzimas algunas son costosas o requieren de equipo especializado. Hasta el momento no se han encontrado reportes del atrapamiento o retención de las enzimas ligninolíticas en copolímeros de acrilamida y acrilato de potasio. El copolímero es comúnmente llamado hidrogel y está compuesto por una red polimérica que tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de disolvente, esto curre gracias a que sus redes tridimensionales son elásticas. La mayoría de las aplicaciones de los hidrogeles está enfocada al campo de la medicina y de la farmacéutica como en la liberación controlada de fármacos [1,3]. Este proyecto se enfoca en conservar la actividad de las enzimas ligninolíticas derivadas del hongo Trametes versicolor utilizando como vector de transporte el copolímero de acrilamida y acrilato de potasio. Se proyecta que el vector ayude a disgregar de manera paulatina las enzimas permitiendo que estas soporten cambios de pH y temperatura. Hasta el ahora se ha trabajado en la estandarización de los porcentajes de absorción y desorción en dos tamaños diferentes de copolímero (1-2 mm y 2-4 mm), y se han mantenido las actividades enzimáticas en ambos procesos. Por otro lado se ha planteado la estandarización de métodos para la determinación de la cantidad de enzima presente en el copolímero. Esta evaluación se hace con la finalidad de implementar en un futuro una opción de bajo costo y fácil manejo para el uso de las enzimas ligninolíticas en industrias donde no se han aplicado antes estos copolímeros como la del papel, textil, entre otras.

Palabras clave: Hongos lignonolíticos; atrapamiento; hidrogel.

REFERENCIAS

[1] Ahmed, E. M. 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Journal of Advanced Research, 6(2), 105-121.

[2] Quintero D. J. C. 2011. Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. Revista Facultad. Nacional de Agronomía de Medellín, 64(1)5867-5882.

[3] Lucio, E. O., Cruz, R. A., Gómez, J. C., y Mendoza, A. M. 2006. Síntesis y caracterización de hidrogeles obtenidos a partir de acrilamida y metilcelulosa. Revista Iberoamericana de Polímeros, 7, 4.

EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTO A SEMILLAS DE MAÍZ CON PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA CONTRARRESTAR *Fusarium moniliforme.*

[1]*Torres-Tapia, M.A., [2]Zamora-Villa, V.M., [2]Jaramillo-Sánchez, M.A., [2]Ramírez-Godina, F., y [2]García-Ozuna, H.

1. Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. CP. 25315
2. Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. CP. 25315.

*Autor para correspondencia: atorres_tapia@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Todo producto agrícola es susceptible al ataque de microorganismos, sobretodo hongos fitopatógenos como *Verticillium, Pythium*, *Fusarium* entre otros; son agresivos, comunes y causan destrucción, tanto en campo como bajo cubierta. Una alternativa es la manipulación directa o indirecta de agentes vivos (control biológico), de forma natural tienden a inhibir patógenos dando resultados favorables. Para respaldar la conservación de semillas, se comparó la efectividad de tres productos biológicos a base de bacterias en diferentes dosis ante un testigo químico comercial como tratamiento en semillas de maíz para contrarrestar diferentes inoculaciones de *Fusarium moniliforme* mediante pruebas fisiológicas. Las bacterias del género *Bacillus,* marcaron una respuesta diferente en la fisiología de la semilla a una inoculación de $1*10^4$UFC/ml de *Fusarium*, se obtuvo mejor germinación al tratar con *Bacillus subtilis* y *Bacillus pomilus* que testigo, sobresaliendo *Bacillus subtilis* más *Bacillus firmus* aumentando germinación y vigor, este producto puede ser alternativo en el control fitopatógeno en la producción de semilla orgánica.

Palabras clave: *Fusarium moniliforme; Bacillus,* semilla, conservación, germinación.

INTRODUCCIÓN

Dentro de nuestro país existe una gran diversidad de hongos altamente adaptables, prácticamente se encuentran en todos los ecosistemas. Si bien en su mayoría cumplen con una función indispensable y benéfica, existen algunos géneros que, desde el punto de vista humano, son dañinas o indeseables y se presenten en gran volumen, dado que son los organismos que más afectan a los cultivos de importancia comercial. De por sí los productos agrícolas son susceptibles al ataque de microorganismos, destacando los hongos fitopatógenos de suelo como *Verticillium, Pythium*, *Fusarium* entre otros; de los cuales estos últimos géneros son los dos agresores de raíces más comunes y destructivos, muy conocidos por los agricultores, ya sea en campo abierto o bajo cubierta; son invasores muy feroces, y a menudo son la causa de la destrucción total de una cosecha. En la tecnología de semillas, un aspecto importante a considerar es la conservación dado por la acción de tratamientos preventivos o correctivos, su propósito es proteger de manera económica, accesible y compatible con el ambiente; y consiste en la aplicación de un ingrediente activo formando una cubierta de protección ante la presencia de plagas y enfermedades asegurando el establecimiento de plantas sanas y vigorosas. Otra medida, es el control

biológico, que se define como la manipulación del hombre de manera directa o indirecta de agentes vivos que de forma natural tienen la capacidad de control. Esta manipulación provoca un incremento de su capacidad de inhibición de los patógenos que en los últimos años ha sido objeto de estudio con resultados favorables en el control de algunas enfermedades en postcosecha [1]. En las zonas o regiones al norte de México los cultivos como algodón, garbanzo, maíz, sorgo y soya, (calabaza) son unas de las especies que tienen más vulnerabilidad hacia estos agentes patógenos; ante ello, algunas empresas preocupadas por reducir el impacto ambiental de bioquímicos, han generado una serie de tratamientos de tipo biológico a base de bacterias del género *Bacillus*, se determinó la efectividad de tres productos biológicos a base de bacterias en diferentes dosis y se comparó con un químico comercial como tratamiento a semillas de maíz para contrarrestar diferentes concentraciones del hongo fitopatógeno *Fusarium moniliforme* mediante pruebas fisiológicas en condiciones de laboratorio, con la finalidad de reunir información para su recomendación de uso de la nueva alternativa de control hacia este patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo en el laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas (CCDTS), localizado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Saltillo Coahuila, México. Se evaluaron semillas de maíz Variedad Cafime de reciente producción (PV, 2016) y almacenada en condiciones favorables para su conservación.

Tratamientos

Se aplicaron ocho tratamientos, basados en productos biológicos de bacterias del género *Bacillus*, teniendo como T1: testigo, utilizando solamente agua destilada; T2: *Bacillus subtilis* aplicando 25mL/100 kg de semilla; T3: *Bacillus subtilis* en una dosis de 250 ml/100 kg de semilla; T4: *Bacillus pomilus* con 25 ml/100 kg de semilla; T5: *Bacillus pomilus* con 250 ml/100 kg de semilla; T6: *Bacillus subtilis* más *Bacillus firmus* en dosis iguales de 25 ml/100 kg de semilla; T7: *Bacillus subtilis* más *Bacillus firmus* en dosis iguales de 250 ml/100 kg de semilla y T8: Máximum XL (metalaxil; tratamiento químico comercial) utilizado a una dosis recomendada de 200 ml/100 kg de semilla.

Metodología

Para la realización del estudio, se trabajó en tres etapas: 1) Propagación del hongo *Fusarium moniliforme in vitro* a partir de una cepa pura en un medio de cultivo PDA líquido, a temperatura ambiente y agitación constante por 15 días; 2) Una vez proliferado el hongo, se determinó la concentración inicial en la proliferación mediante la cámara de Neubauer y se realizaron tres diluciones de UFC del hongo a $1x10^2$ UFC/ml (S2), $1x10^3$ UFC/ml (S3), $1x10^4$ UFC/ml (S4) y un testigo con agua estéril (S1); cada dilución se inoculó en sustrato peat most estéril, todo este proceso fue en condiciones estériles y bajo una campana de flujo laminar. 3) Se sembraron 20 semillas por repetición de cada tratamiento, teniendo 4 charolas por tratamiento de semilla por cada concentración del hongo *Fusarium moniliforme*. Al término de la siembra, las charolas se colocaron en una cámara de germinación a 25 ± 1 ºC con 8 horas luz y 16 horas de obscuridad por 7 días, haciendo un riego al tercer día con agua destilada estéril. Una vez transcurrido los 7 días, se determinó la respuesta fisiológica.

Variables evaluadas

Para evaluar la respuesta, se realizó mediante la prueba de capacidad de germinación comprendiendo las variables: porcentaje de Plántulas Normales (PN), Plántulas Anormales (PA) y Semillas sin Germinar

(SSG); y las pruebas de vigor mediante la Longitud Media de Plúmula (LMP) y Longitud Media de Radícula (LMR), todas ellas mediante las reglas internacionales [2] y el manual de evaluación [3].
El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones, bajo un arreglo factorial, considerando como factores principales el tiempo y el tratamiento utilizando, la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de tukey con un alfa de 0.5 [4].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba de capacidad de germinación

Se encontró diferencia significativa en la variable PN, en las fuentes de variación de sustrato inoculado y la interacción sustrato inoculado por tratamiento; en PA en sustrato inoculado y alta significancia en esta última y SSG entre tratamientos. En la prueba de comparación de medias en PN entre los sustratos inoculados, S1 y S4 resultaron estadísticamente iguales con 62.6 y 62.7%, seguidos S2 y S3 en el mismo grupo estadístico. Sin embargo, en PA, S1 presentó el menor valor de anormalidades con 13.8%, seguido S4 con 14.9%, aunque estadísticamente estuvieron en el mismo grupo; mientras que S2 y S3 formaron el segundo grupo con 18.1 y 19.2%. La aplicación de bacterias en la germinación de la semilla de maíz obtuvo un efecto favorable, ya que el sustrato a pesar de tener una concentración mayor de patógeno (*Fusarium)* no logró afectar de manera dramática como lo afirmaron [5], que este hongo afecta significativamente el establecimiento de plántulas, debido a la aplicación de bacterias como *B. pumillus*, proveyendo posiblemente de protección a la semilla previniendo la germinación de las esporas del *Fusarium* como lo mencionó [6], logrando de manera significativa una germinación similar al testigo y la más alta concentración de patógeno en el sustrato.

Además, se logró detectar un efecto del hongo por las concentraciones S2 Y S3 al encontrar una disminución PN y aumento PA, debido tal vez a la acción del *Fusarium* desde la imbibición de semilla hasta la emergencia produciendo infecciones asintomáticas y sintomáticas en semilla; que una vez que el hongo logra infectar afecta la emergencia de la plántula, logrando colonizar tejidos de la planta durante todo su ciclo vegetativo, incluyendo raíz, tallo, mazorca y semillas [7].

Interacción de capacidad de germinación entre tratamientos

En la prueba de comparación de medias entre tratamientos en la variable PN, sobresalió T7 en comparación T1, dando un efecto positivo la aplicación de bacterias, y aún más cuando dos especies están combinadas o por lo menos se refleja el aspecto de protección a la semilla de maíz, logrando no haber afectado el proceso de germinación, como fue en T2, T3, T4 y T8. En PA, T1, T2 y T7 presentaron menor porcentaje y representaron el último grupo estadístico, destacando nuevamente T7 con 10. 9 % en comparación a T1 con 13.75%. Reafirmando que el uso de bacterias pudieran tener un efecto promotor de crecimiento produciendo citocininas en la rizosfera, e influir positivamente en el crecimiento vegetal [8]; u otras sustancias fitoestimuladoras, fitohormonas, compuestos orgánicos volátiles activando la producción o refuerzan la inmunidad vegetal como ácido jasmonico, ácido salicilico y fitoalexinas [9].

Capacidad de germinación en la interacción concentración de inoculo por tratamientos

En la capacidad de germinación, de manera general los resultados reflejan un efecto causado por las bacterias de diferentes especies, en S1 con T1 en comparación a los demás tratamientos presentó un bajo porcentaje, a excepción de T5 quien no tuvo efecto en la germinación (Figura 1). A pesar de que T1 presentó mayor germinación en sustrato con agua, se logra detectar que algunos tratamientos tienen

efectos favorables en S2, S3 y S4, destacando T7 similar germinación pero declinó conforme aumento la concentración del hongo *Fusarium,* teniendo además una disminución de PA y aumento de SSG, posiblemente las bacterias, pudieron haber manteniendo al hongo en límite para no causar daño a la germinación mediante los mecanismos indirectos, al sintetizar antibioticos u otros compuestos de tipo lipopeptidico que ejercen un efecto inhibitorio sobre organismos fitopatogenos [10] [11], confirmado [12] al mencionar que los lipopeptidos pueden suprimir el crecimiento de fitopatogenos. Sin embargo, T3, T4 y T6 presentaron un efecto contrario en S4, lo uqe pudiera reflejar que las bacterias también tienen características de promoción de crecimiento liberando hormonas con funciones específicas, al encontrarse en simbiosis con la plántula, coincidiendo con [13] al tratar semillas de maíz con bacteria *Psudomonas fluorescens*, mejoró la emergencia e incremento de la germinación.

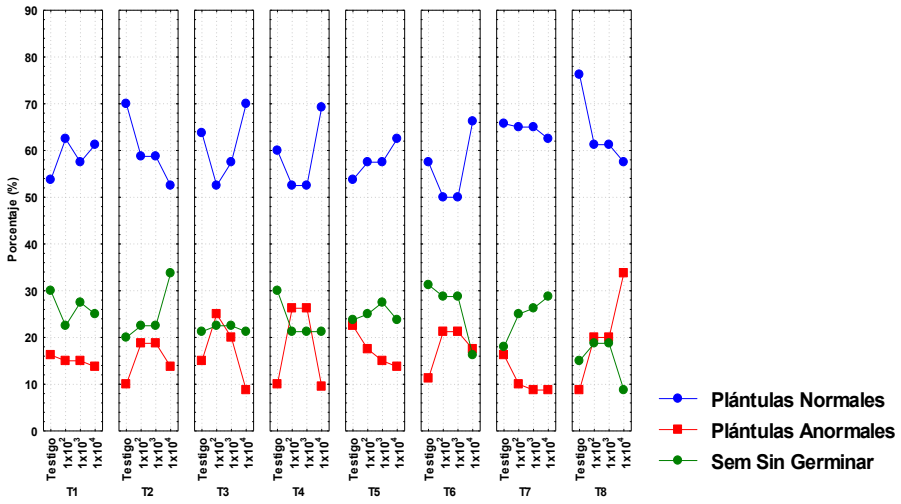


Figura 1. Respuesta de la capacidad de germinación entre la interacción de sustrato inoculado por el tratamiento de bacterias.

Vigor

Los resultados de ANVA, indicaron que los sustratos inoculados con *Fusarium* en las variables LMP y LMR de plántulas, tuvieron diferencias altamente significativas y significativas entre tratamientos y su interacción. Destacando que el sustrato sin *Fusarium* (S1), resulto tener los mayores valores de LMP (11.2 cm) y LMR (20.6 cm) en comparación al resto de los sustratos inoculados. En la comparación de medias entre tratamientos en LMP, sobresalieron T3, T4, T5, T6, T7 y T8 con la mayor longitud promedio; mientras en LMR, T1, T4, T6, T7 y T8, destacando T7 con 20.3 cm, siendo T5 el de menor longitud con 17.4 cm. El efecto de las bacterias muestra que a mayor concentración, mejor respuesta de raíz y aún al tratar la semilla con bacterias puede generar un efecto favorable permitiendo el crecimiento de las plántulas, concordando con diferentes estudios, inoculando bacterias en distintas especies, provocando crecimiento aéreo-raíz en plántula, mayor biomasa, promoción de raíces laterales y pelos radiculares [14] [15].

En la Figura 2, la respuesta de LMP en la interacción sustratos por tratamientos resulto muy similar. Sin embrago, testigo (S1) presentó el mejor promedio de LMR, donde T1 obtuvo 22.3 cm, T2, T3, T4, T6, T7

y T8; mientras T5, presentó la más baja longitud tanto en S2 como S3, y decayó aún más en S4 hasta 16.9 cm.

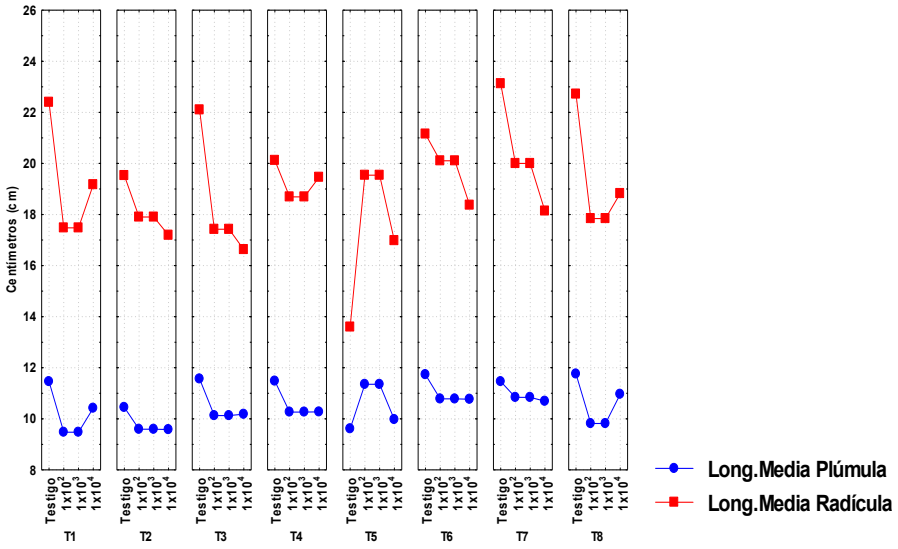


Figura 2. Respuesta de la capacidad de germinación entre la interacción de sustrato inoculado por el tratamiento de bacterias.

CONCLUSIONES

- El recubrimiento de semilla de maíz, con productos biológicos a base de bacterias del género *Bacillus,* permiten competir con los tratamientos químicos comerciales, debido a su actividad directa e indirecta que desarrollan, teniendo un efecto en el control del hongo fitopatógeno *Fusarium moniliforme*, así como en la respuesta fisiológica de la semilla.
- La combinación de bacterias produce una efecto mayor y positivo en la capacidad de germinación y vigor de la semilla al tratar la semilla con *Bacillus subtilis* más *Bacillus firmus* en dosis iguales de 250 ml/100 kg de semilla, aún en condiciones de sustrato infectado por *Fusarium moniliforme* compartiendo el mismo efecto que un tratamiento químico comercial en concentraciones de $1*10^3$ y $1*10^4$ UFC/ml.

REFERENCIAS

[1] V. A. Ramón y F. Rodas. "El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo". Venezuela. Pp. 14-16, 2007

[2] ISTA. International Seed Testing Association International. "Rules For Seed Testing". Chapter 3and. ISBN 3-906549-38-0. Zurich, Suiza. 243p, 2004.

[3] AOSA (Association of Oficial Seed Analysis). "Rules for testing seeds". Journal of Seed Technology, 6 (2): 1-126, 1992.

[4] SAS Institute Inc.. Base SAS® 9.1.3 Procedures Guide. Second Edition, Vol. 4. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA. 398 p., 2009

[5] J. Alezones y A. Gonzales. "Efecto de diferentes fungicidas sobre la incidencia de *Fusarium verticillioides".* Fitopatología de Venezuela. Vol. 22, No. 2.Pp 31 y 32, 2009

[6] T. Anderson. "Biological control of soybean diseases". Ins. Gnanamanickam (Ed.), biological control of crop diseases. Marcel Dekker Ltd., New York. 2002

[7] D. G. White. "Plagas y enfermedades del maíz". The American Phytopathological Sociate. 2da Ed. Mundi- Prensa, México 77 p. 2004.

[8] T.N. Arkhipova, S.U. Veselov, AI Melentiev, E.V. Martynenko, G.R. Kudoyarova. "Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants". *Plant and Soil* 272:201-209. 2005.

[9] F. Ahmad, I. Ahmad, M.S. Khan. "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities". *Microbiological Research* 163:173-81, 2008.

[10] V. Leclère, M. Béchet, A. Adam, J.S. Guez, B. Wathelet, M. Ongena, P. Thonart, F. Gancel, M. Chollet-Imbert, P. Jacques. "Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities". *Applied and Environmental Microbiology* 71:4577–4584, 2005.

[11] M. León, P.M. Yaryura, M.S. Montecchia, A.I. Hernández, O.S. Correa, N.L. Pucheu, N.L. Kerber y A.F. García. "Antifungal activity of selected indigenous pseudomonas and bacillus from the soybean rhizosphere". *International Journal of Microbiology* 57:20-49, 2009.

[12] X.H. Chen, A. Koumoutsi, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Süssmuth, J. Piel, R.J. Borriss. "Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens". *Biotechnology* 140:27-37, 2009.

[13] N.S. Chandra, S.A.C. Udaya, M.S. Reddy, S.R. Niranjana, H.S. Prakash, H. S. Shetty and M.C.A.N. Paulino. "Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticilloides* and fumonisinas in maize". Archives of phytopathology and plant protection 43(3):264-282, 2008.

[14] J. C. Martín, P.S. Medina y A. D. Morales. "Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin)". Trop. Subtrop. Agroecosys. 4: 21-27, 2004

[15] S. Sharafzadeh. "Effects of PGPR on growth and nutrients uptake". IJAET 2: 27-31, 2011.

DESARROLLO DE UN MÉTODO MOLECULAR PARA EVALUAR LA COLONIZACIÓN DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS.

[1]Aranda-Díaz, S., [2]Huerta-Robles, A.X., y [1]Beltrán-Garcia, M.J.

1. Departamento de ciencias Químicas, Laboratorio de investigación 309; Universidad Autónoma de Guadalajara
2. Instituto de ingeniería; Universidad Autónoma de Baja California.

Autor para correspondencia: samael.aranda@edu.aug.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Los microorganismos endófitos juegan diversos papeles en las plantas, entre estos destacan la asimilación de nutrientes, la fijación biológica de nitrógeno, un efecto protector contra el estrés y la supresión de patógenos. Se ha establecido que una vía de transmisión de los endófitos hacia las plántulas es a través de las semillas. En las semillas no es clara la localización, así como las comunidades que colonizan esta estructura de reproducción. Nosotros estudiamos reciente la ecología microbiana de las semillas de cultivos como el maíz y el Agave. Por otro lado, nuestro interés de investigación es desarrollar formulaciones microbianas que apoyen el desarrollo de la planta disminuyendo el uso de fertilizantes y pesticidas químicos. Por lo que es necesario entender la colonización de los mismos en los tejidos. Así también hemos propuesto que las bacterias de las semillas se mueven en las etapas iniciales de la formación de la plántula del embrión hacia las raíces, por lo que la colonización de la raíz y posiblemente del suelo dictaminen el comportamiento en el desarrollo e implantación del cultivo. La metodología está basada en tres puntos importantes: Inoculación de plantas con las bacterias, Método molecular (Extracción de ADN, evaluación de planta para determinar condición axénica, Purificación de ADN de producto de PCR, Determinación del grado de colonización en raíces inoculadas con bacterias, Restricción enzimática para secuencia desconocida) y el análisis de inoculación en tejido vegetal a nivel de raíz. En este trabajo hemos desarrollado un método de PCR que involucra secuencias específicas de mitocondrias vegetales y el 16s del ADNr tanto en sentido como en antisentido en la amplificación del ADN, así como el análisis de restricción tipo ARDRA. Nuestros resultados soportan nuestra hipótesis de movimiento de las bacterias hacia las raíces en las plantas de maíz.

Palabras clave: Biología molecular, Endofíta, PCR, Restricción enzimática.

REFERENCIAS

[1] Baeshen, M. N. (2017). Metagenomics of Microbial Communities Associated with the Rhizosphere of the Saudi Desert Medicinal Plants. EC Microbiology ECO, 1, 31-33.

[2] Roossinck, M. J., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2015). Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. Phytopathology, 105(6), 716-727.

[3] Vivian, A. (1999). Subcellular Biochemistry Volume 29: Plant-microbe Interactions. Plant Pathology, 48(2), 296.

[4] Zgadzaj, R., James, E. K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D. B., ... & Radutoiu, S. (2015). A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. PLoS genetics, 11(6), e1005280.

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS RELATED TO THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CHICKPEA GENOTYPES.

Saracho-Peña, A.G., López-Valenzuela, J.A., Quintero-Soto, M.F., Salazar-Salas, N.Y., López-Moreno, H.S., Pineda-Hidalgo, K.V., Garzón-Tiznado, J.A. y *Chávez-Ontiveros, J.

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sin., México.

*Autor para correspondencia: jchontiveros@uas.edu.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Chickpea (Cicer arietinum L.) is a good source of carbohydrates, proteins, fiber, vitamins, minerals and bioactive compounds such as phenolic compounds, which provide health benefits associated mainly with their antioxidant properties [1-3]. The objective of this work was to identify phenolic compounds responsible of the antioxidant activity in chickpea genotypes. Eighteen chickpea genotypes (9 kabuli and 9 desi types) were cultivated at the experimental field of INIFAP in Culiacan, Sinaloa. Methanol extracts [2] were prepared from mature seed flours and used to determine total phenolics content (TPC), in vitro antioxidant activity (AA) and phenolics profiles. TPC was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, which forms a blue color compound with maximum absorption at 750 nm that is proportional to the concentration of phenolic compounds. The AA was measured by three colorimetric methods (ABTS, DPPH, FRAP) and the results were expressed as micromoles Trolox Equivalents (TE). Phenolic profiles were determined by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). The compounds were detected at 280, 320 and 350 nm, whereas their identification was done by comparison with the retention time, UV spectrum, and fragmentation pattern of commercial standards, as well as databases reported in the literature. A wide variability in total phenolics content and antioxidant activity was observed in the two types of chickpea, which reflects their great genetic diversity. The desi genotypes had a higher average of total phenolics content than kabuli (159.97 and 38.28 mg GAE/ 100g), as well as higher antioxidant activity by ABTS (1,905.77 and 574.24 µmol TE/ 100g), DPPH (839.04 and 136.93 µmol TE/ 100g) and FRAP (501.31 and 103.82 µmol TE/ 100g), which corresponds with previous reports [1, 3]. Eight phenolic acids and 12 flavonoids were identified; phenolic acids were more abundant in kabuli than desi genotypes, whereas the opposite was observed for flavonoids. The levels of myricetin, kaempferol, isorhamnetin and quercetin showed high positive correlations with the antioxidant activity by ABTS (r=0.94, p=0.00; r=0.96, p=0.00; r=0.96, p=0.00; r=0.97, p=0.00), DPPH (r=0.97, p=0.00; r=0.96, p=0.00; r=0.96, p=0.00; r=0.95, p=0.00) and FRAP (r=0.93, p=0.00; r=0.90, p=0.00, r=0.84, p=0.00, r=0.86, p=0.00), suggesting that these flavonoid compounds are the main responsible for the antioxidant activity of the grain in the studied chickpea genotypes.

Palabras clave: Chickpea; Phenolics; Antioxidant Activity.

REFERENCIAS

[1] S. Magalhaes et al, "European marketable grain legume seeds: Further insight into phenolic

compounds profiles," Food Chemistry, vol. 215, pp. 177-184, 2017.

[2] Y. N. Sreerama, V. B. Sashikala and V. M. Pratape, "Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: Evaluation of their antioxidant properties," Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 58, pp. 8322-8330, 2010.

[3] S. A. Marathe et al, "Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India," Food and Chemical Toxicology, vol. 49, pp. 2005-2012, 2011.

MANEJO SUSTENTABLE DE MELOIDOGYNE INCOGNITA UTILIZANDO EL EXTRACTO VEGETAL DE (LEUCAENA LEUCOCEPHALA) EN EL CULTIVO DE (*Lycopersicum esculentum*) EN ATLATLAHUCAN, MORELOS.

*Hernández-Navarro, A., Jiménez-Castañeda, V., Sánchez-Ríos, J.L., Perea-Cantero, A. y Sánchez-Martínez, M.C.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco1, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán.

*Autor para correspondencia: angyphc@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El cultivo de jitomate (*Lycopersicum esculentum*), es de gran importancia económica a nivel mundial, es un excelente hospedero de algunos géneros de nemátodos, destacando *Meloidogyne spp.* El objetivo de este trabajo fue evaluar extracto de guaje (*Leucaena leucocephala*). Se realizaron 3 tratamientos con 5 repeticiones con un diseño completamente al azar. El efecto de los extractos sobre *Meloidogyne spp*.T1 agua destilada, tiene menor efecto con un porcentaje de 2.05%, T2 extracto de semilla de guaje, con 72.54%, y el T3 vainas de guaje 87.05%, el estudio realizado se desprende que el uso extractos vegetales es una alternativa ecológica, económicamente viable y socialmente aceptable para el manejo sustentable de utilizar para el control de *Meloidogyne spp* y probablemente de otros nematodos fitopatógenos que afectan al cultivo de jitomate, disminuyendo con ello el uso de nematicidas químicos.

Palabras clave: *Lycopersicum esculentum; Meloidogyne spp; Leucaena leucocephala nematicida.*

HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum L.*) EN ATZALAN VERACRUZ.

*Jiménez-Castañeda, V., Cuellar-Yañez, N.B., Nava-Gómez, S., Dorado-Morales, M. y Sánchez-Rios, J.L.

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, División de Ciencias biológicas y de la Salud, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Licenciatura de Agronomía. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud, delegación Coyoacan, México D.F.

*Autor para correspondencia: vjimenez@correo.xoc.uam.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es una planta de la familia de las solanáceas, cultivada en casi todo el mundo por su tubérculo comestible. Es originaria del altiplano andino. La importancia económica del cultivo de papa en México se debe a la generación de mano de obra y su importancia alimentaria. Las principales enfermedades en papa son:"Sarna polvorienta" causada por *Spongospora subterránea*, Tizón tardío" causado por *Phytophthora infestans*, "Tizón temprano" causada por *Alternaria solani*. "Pudrición seca" causada por *Fusarium spp*. El objetivo de esta investigación fue: Identificar agentes fitopatógenos presentes en el cultivo de papa en Atzalan Veracruz. Se recolectaron muestras de hojas, raíces y tubérculos a partir de un muestreo directo en una parcela con una superficie de una hectárea. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de fitopatología. Se hizó la siembra de muestras en cajas de Petri en PDA. Se llevaron las cajas a una estufa con una temperatura de 28 °C por 48 horas. Para la correcta identificación se realizó la resiembra. Se encontró *Alternaria sp*, la cual se presenta en forma de anillos concéntricos, *Phytophthora sp*, los síntomas son lesiones necróticas de color castaño, en el tubérculo encontramos *Spongospora sp* la cual ocasiona lesiones de pústulas abiertas y *Fusarium sp*, que produce pudrición de tubérculos.

Palabras clave: Atzalan; Veracruz; enfermedades de la papa; Alternaria

IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa L.*) EN MIXQUIC.

[1]Jiménez-Castañeda, V., [1]Galarza-Ballesteros, A., [1]López-Morales, J.C., [1]Peralta-Muñoz, C.A., [1]Quintana-Solis, J., [1]Rangel-Urbina, R., [1]Sánchez-Rios, J.L. y [2]Hernández-Navarro, A.

1. Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, División de Ciencias biológicas y de la Salud, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Licenciatura de Agronomía. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud, delegación Coyoacan, México D.F.
2. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Sanidad Vegetal, Estado de México

*Autor para correspondencia: vjimenez@correo.xoc.uam.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La producción de lechuga es una de las actividades más rentables, debido a su gran demanda a nivel nacional e internacional, y como consecuencia altos ingresos económicos para los productores. La lechuga es una planta anual nativa de regiones templadas, pertenece a la familia *Compositae*, cuyo nombre científico es *Lactuca sativa L*. En los últimos años, la lechuga está siendo afectada por una serie de patógenos que de forma importante reducen su producción. El objetivo de esta investigación fue identificar los agentes patógenos asociados al cultivo de lechuga y determinar el índice de incidencia de la enfermedad. El muestreo se realizó en una parcela de la zona chinampera de San Andres Mixquic, delegación Tláhuac. El aislamiento se hizo en el medio PDA para hongos, y B de King para bacterias, después se incubaron las cajas Petri por 72 horas a una temperatura de 28oC, se observó el crecimiento de hongos y bacterias y se procedió a la identificación de hongos y bacterias. Los agentes patógenos identificados fueron el hongo *Alternaria sp* y la bacteria *Pseudomonas fluorescens* el índice de incidencia fue de un 58%, lo que indica que este cultivo presenta perdidas severas.

Palabras clave: Mixquic; *Lactuca sativa; Alternaria*; *Pseudomonas fluorescens*.

REFERENCIAS

[1] Alcázar O. J. 2010. Manual Básico de Producción de Hortalizas.
[2] Almodovar I.W. 2001. Clínica al día. Colegio de Ciencias Agrícolas
[3] Prudencio S. J., Navarrete M. R. Y AcostaG.J. 2008. Dinámica de los Tizones Común y del halo del frijol en el Valle de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

TOLERANCIA AL DÉFICIT HÍDRICO EN EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa*) CO-INOCULADO CON PGPR CON ACTIVIDAD ACC DEAMINASA.

[1]*Cedeño, G., [2]Gerding, M., [3]Inostroza, L. y [2]Ficher, S.

1. Departmento de Agronomía, UniversidadTécnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador
2. Facultad de Agrnomía, Universidad de Concepción, Chillan, Chile
3. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Quillamapu, Chillan, Chile

*Autor para correspondencia: gcedeno@udec.cl

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

En Chile el cultivo de alfalfa es la forrajera más producida, adaptada a las condiciones de clima Mediterráneo, sin embargo la producción de forraje bajo condiciones de sequía es muy variada, reduciendo el crecimiento óptimo. a través de co-inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) se han logrado mejoras importantes de los cultivos en condiciones de ambientes estresantes. El objetivo del presente trabajo fue co-inocular *Sinorhizobium meliloti* – PGPR con actividad ACC deaminasa en respuesta de la alfalfa en tolerancia a la sequía. En macetas de tubos PVC de 11L de capacidad con un sustrato de mezcla perlita vermiculita 1:1 v/v se sembraron semillas de alfalfa cultivar Alta Sierra Illapata. Fueron inoculadas cepas de Bacillus sp. y *Pseudomonas sp* con actividad ACC deaminasa reportada. A los 45 días de crecimiento con riego controlado, fueron sometidas a un periodo de sequía durante 20 días. Se evaluó el número de nódulos, la conductancia estomática, área específica de las hojas y la fluorescencia la clorofila. La nodulación fue mejorada en un 60% bajo condiciones de crecimiento sin déficit hídrico y en un 20% en condiciones de sequía. La conductancia estomática fue de 142 mol m2 s-1 con PGPR *Bacillus sp* en comparación al control sin presencia del PGPR con actividad ACC deaminasa cuyo valor fue de 86 mmol m2 s-1. El área foliar especifica mayor en un 20% con en los tratamientos co-inoculados con PGPR. El efecto ACC deaminasa bacteriano también se reflejó sobre la fluorescencia de la clorofila manteniendo un mejor rendimiento cuántico del fotosistema dos durante las horas de mayor intensidad luminosa, así mismo se mejoró el Fv/Fm. En conclusión de a acuerdo a resultados obtenidos en esta investigación, el efecto beneficioso generado por bacterias promotoras del crecimiento vegetal con actividad ACC deaminasa mejora aspecto características fisiológicas y agronómicas claves en la tolerancia al déficit hídrico en el cultivo de alfalfa.

Palabras clave: PGPR; deficit hídrico; alfalfa; ACC deaminasa.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y TIPO DE EXPLANTE EN LA INDUCCIÓN DE CALLO DE ESTEVIA.

[1]Tirado-Pérez, B., [1]Qui-Zapata, J., [1]Rodríguez-Garay, B., y [1]*Gutiérrez-Mora, A.

1 Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019 Zapopan, Jalisco, México. C.P. 45019.
2 Agrostevia S.A.P.I. de C.V. Monte Caucaso Ext. 915, Interior 307. Lomas de Chapultepec. Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México. C.P. 11000.

*Autor para correspondencia: agutierrez@ciatej.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN
La principal causa del bajo éxito en la inducción de embriogénesis somática en estevia se debe, probablemente, al tejido recalcitrante de esta especie. La inducción de embriogénesis somática depende principalmente del medio de cultivo, explante y genotipo. El objetivo del trabajo fue evaluar el medio de cultivo y explante en dos condiciones de incubación sobre la inducción de callo de estevia. Se evaluaron tres medios de cultivo suplementados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético*, bencilaminopurina* y tidiazuron*, tres concentraciones de sacarosa, dos tipos de hojas y dos condiciones de incubación. El pH de los medios fue ajustado a 5.8 y gelificado con 7 g L^{-1} de agar. De acuerdo al análisis de varianza se observaron diferencias significativas para el factor medio de cultivo (P=0.000) y sacarosa (P=0.013). La interacción del medio de cultivo y la concentración dos de sacarosa favoreció a la inducción de callo (P=0.005). La coloración del callo fue, en su mayoría, café y de consistencia compacta. Los medios de cultivo constituidos por 2,4-D y BAP y la concentración dos de sacarosa resultaron más efectivos en la inducción de callo. *Datos confidenciales.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana* Bertoni; embriogénesis somática; callo; estructuras proembriogénicas.

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta perenne originaria de Paraguay que pertenece a la familia Asteraceae [1]. Las hojas y tallos de estevia contienen glucósidos diterpénicos, los cuales son de 200 a 300 veces más dulces que la sacarosa [2].

La demanda de endulzantes naturales está en aumento debido a los efectos adversos que producen los edulcorantes artificiales en el cuerpo humano. Por esta razón, el cultivo de estevia se ha incrementado [3]. Países como Japón e Israel cultivan esta planta desde hace más de 40 años [4]. Con respecto a México, durante el 2011, se sembraron 36 hectáreas de estevia [5]. No obstante, este cultivo enfrenta problemas fitosanitarios, principalmente, el daño causado por hongos y oomicetos [6].

Además de las enfermedades que ocasionan pérdidas económicamente significativas, el alto porcentaje de semillas estériles es otro grave problema que dificulta la propagación [7]. En adición, la floración y maduración de la semilla son altamente heterogéneas. Debido a esto, se utilizan estacas en los cultivos comerciales, pero la limitante es la baja tasa de multiplicación [8].

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales mejoran y aceleran el sistema de multiplicación y conservan la uniformidad genética. El primer reporte de micropropagación en estevia corresponde a Tamura et al. en 1984 [9], quienes utilizaron yemas cultivadas en medio Linsmaier y Skoog [10] suplementado con 10 mg L^{-1} de cinetina (KIN). Por otra parte, Bespalhok y et al. en 1997 [11] obtuvieron callo embriogénico en un 42%, a partir de flores de estevia en medios formulados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) más KIN. No obstante, al utilizar 6-N-Bencilaminopurina (BAP) observaron mayor crecimiento y calidad de callos. De igual manera para la inducción de callos de estevia, Kryvenki et al. en el 2008 [12] utilizaron 2,4-D y 40 y 60 g L^{-1} de sacarosa, con períodos de subcultivo de 45 a 50 días.

Por su parte, Suárez y Salgado en el 2008 [13] utilizaron hojas de plantas *in vitro* para inducir callo de estevia. Obtuvieron hasta 313.4 mg de callo en los medios adicionados con 0.5 mg L^{-1} de ácido naftalenacético (ANA) más 1.0 mg L^{-1} de BAP. Adicionalmente, al incrementar la cantidad de ANA a 1.0 mg L^{-1} y adicionar 4.0 mg L^{-1} de BAP obtuvieron organogénesis. Asimismo, Ahmad et al. en el 2011 [14] obtuvieron en promedio 15.2 y 21.6 brotes a partir de explantes florales sembrados en medios Murashige y Skoog (MS) [15] adicionados con 1.5 y 2.0 mg L^{-1} de BAP respectivamente.

En algunos casos, el cultivo de tejidos vegetales se encuentra asociado a varios inconvenientes de calidad fisiológica, genética y epigenética, entre ellos, recalcitrancia, hiperhidricidad y variación somaclonal [16]. Sin embargo, tiene alcances importantes para los programas y estrategias de fitomejoramiento [17]. En este sentido, la embriogénesis somática (ES) es una herramienta biotecnológica que permite la regeneración y multiplicación de plantas como parte del proceso de mejoramiento genético.

Con respecto a la ES en estevia, como se mencionó anteriormente, se reportan algunos trabajos en los que, si bien, han obtenido callo embriogénico y la posterior formación de algunos embriones somáticos, no ha sido posible que se logre la maduración [11]. En estos trabajos también reportaron el uso de 2,4-D, y BAP como indispensables para la inducción de callo, a partir de hojas y en condiciones de oscuridad y 16 h de fotoperíodo. El callo en su mayoría fue compacto y de color amarillo o verde claro, con formación de embriones en la superficie [18].

Cabe destacar que, durante la inducción de ES, uno de los elementos clave es la identificación de las características del callo embriogénico, el cual tiene el potencial de formar ES al cambiar la composición del medio de cultivo.

Es un hecho que, el mejoramiento genético vegetal a través de herramientas biotecnológicas es una alternativa para generar variantes resistentes al ataque de microorganismos patógenos. Sin embargo, como una primera etapa se requiere la generación protocolos de embriogénesis somática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni variedad Morita II establecidas *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco, A. C. Se sembraron dos tipos de explantes, los cuales fueron hojas con tallo (I) y segmentos de hojas vitrificadas (hiperhidratadas) (II).

Medios de cultivo

Se formularon nueve medios de cultivo a partir de tres combinaciones de reguladores del crecimiento: 2, 4-D*, BAP* y tidiazuron* (TDZ) y tres concentraciones de sacarosa 1=30, 2=40 y 3=60 g L^{-1}. Se utilizó el medio de cultivo basal MS. El pH de los medios se ajustó a 5.7 con NaOH 1 M, se adicionó 7 g L^{-1} de agar y se esterilizó a 121±1 °C y 1.2 kg cm^{-2} durante 15 minutos. *Datos confidenciales.

Condiciones de cultivo

Los explantes en los respectivos medios de cultivo fueron sometidos a dos condiciones de incubación, a 16 h luz (25 µm m^{-2} s^{-1}) y a oscuridad continua a 25±1 ºC.

Variables de respuesta

Se evaluó la formación de callo, de acuerdo con una escala visual, considerando para ello valores de 0 equivalente a explantes sin formación de callo y 25, 50, 75 y 100% de callo para los explantes con desarrollo de callo. Además, se observó el tipo de callo el cual fue definido como compacto, friable o mixto (compacto y friable) y la coloración observada correspondió a café, cristalina, verde y amarilla.

Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14, 30 y 150 días. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con el programa estadístico Statgraphics Centurion XV. Se consideraron únicamente los datos de la evaluación de los 150 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callo

De acuerdo con el ANOVA, en la variable formación de callo (cuadro 1), se observaron diferencias significativas en el factor medio de cultivo (P=0.0000) y en la concentración de sacarosa (P=0.0138). También se presentaron diferencias en las interacciones medio de cultivo y sacarosa (P=0.0059), medio de cultivo y tipo de explante (P=0.0000), sacarosa y explante (P=0.0028) y explante y condiciones de incubación (P=0.0251).

Cuadro 1. Análisis de varianza de la variable formación de callo.

Fuente	*gl*	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales				
A: Medio de cultivo	2	34875.0	39.61	0.0000*
B: Sacarosa	2	3875.0	4.40	0.0138*
C: Explante	1	500.0	0.57	0.4522
D: Incubación	1	55.5	0.06	0.8020
Interacciones				
AB	4	3312.5	3.76	0.0059*
AC	2	11375.0	12.92	0.0000*
AD	2	1763.8	2.00	0.1383
BC	2	5375.0	6.10	0.0028*
BD	2	1263.8	1.44	0.2411
CD	1	4500.0	5.11	0.0251*
Residuos	160	880.5		
Total (Corregido)	179			

*Valor p significativo con nivel de significancia de α=0.05.

En el cuadro 2, se observó que los medios de cultivo uno (2,4-D más BAP) y dos (2,4-D, BAP y TDZ) favorecieron a la formación de callo de estevia, 51.66 y 59.16% respectivamente, contrario a los medios que contenían TDZ como único regulador del crecimiento (14.16%) (Tukey p≤0.05). Por su parte, Banerjee y Sarkar en el 2009 [19] reportaron el mismo efecto para la formación de callo, aunque en mayor porcentaje (96%) con la combinación de 2,4-D, BAP y TDZ. Además, observaron que los callos que obtuvieron fueron en su mayoría friables de color amarillo verdoso, lisos y compactos, los cuales produjeron embriones somáticos al ser tranferidos a medio fresco con BAP y menor concentración de 2,4-D.

Por otra parte, en el presente trabajo el bajo porcentaje de formación de callos, en los medios con TDZ, fue debido a la formación de brotes. De igual manera, pero en otro tipo de explante (hipocotilos) Kim et al. en 1997 [20] evaluaron el efecto del TDZ, en concentraciones bajas, sobre la organogénesis de *Liquidambar styraciflua*. Por su parte, Murthy et al. en 1998 [21] señalaron que el TDZ puede inducir diferentes respuestas morfogénicas desde la formación de callos hasta embriones somáticos.

En relación a la concentración de sacarosa también se observaron diferencias significativas (Tukey p≤0.05). La concentración uno permitió mayor inducción de callo en los explantes respecto a la tres. Si bien, con las tres concentraciones de sacarosa no se obtuvieron altos porcentajes de callo (Tukey p≤0.05), es importante señalar que la disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo influye de manera directa en la ES [22]. De acuerdo con Valverde y Villalobos en el 2000 [23] las concentraciones de sacarosa de 40 y 60 g L^{-1} favorecen a la formación de callo y diferenciación de ES en cacao. No así para estevia, en donde es necesario evaluar otras concentraciones de sacarosa. Con respecto a los factores tipo de hoja y condiciones de incubación, no se observaron diferencias significativas (Tukey p≤0.05).

Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo, concentración de sacarosa, tipo de explante y condición de incubación sobre la inducción de formación de callo de estevia. Evaluación a los 150 días.

Factores	Callo (%)	
Medio de cultivo		
1: 2,4-D + BAP	51.66	a
2: 2,4-D + BAP + TDZ	59.16	a
3: TDZ	14.16	b
Concentración de sacarosa (g L^{-1})		
1: 30	47.5	a
2: 40	45.0	ab
3: 60	32.5	b
Tipo de hoja		
I	43.3	a
II	40.0	a
Condiciones de incubación		
Luz (12h)	42.22	a
Oscuridad (24 h)	41.11	a

[†]Valores con letras iguales no presentan diferencia significativa (Tukey p≤0.05).
I: hoja normal y II: hoja vitrificada.

Por otra parte, en la gráfica de interacción (Figura 1) se observa que la concentración de sacarosa dos (40 g L^{-1}) y la formulación del medio de cultivo uno, adicionado con 2, 4-D y BAP favorecieron en mayor medida el crecimiento de callo en los explantes. Por el contrario, la interacción del medio de cultivo tres, adicionado únicamente con TDZ más sacarosa tres (60 g L^{-1}) fue en la que se obtuvo menor crecimiento de callo. Sin embargo, como ya se había mencionado anteriormente, esta formulación del medio de cultivo permitió el desarrollo de brotes a los 90 días en los explantes que se encontraban bajo condiciones de luz.

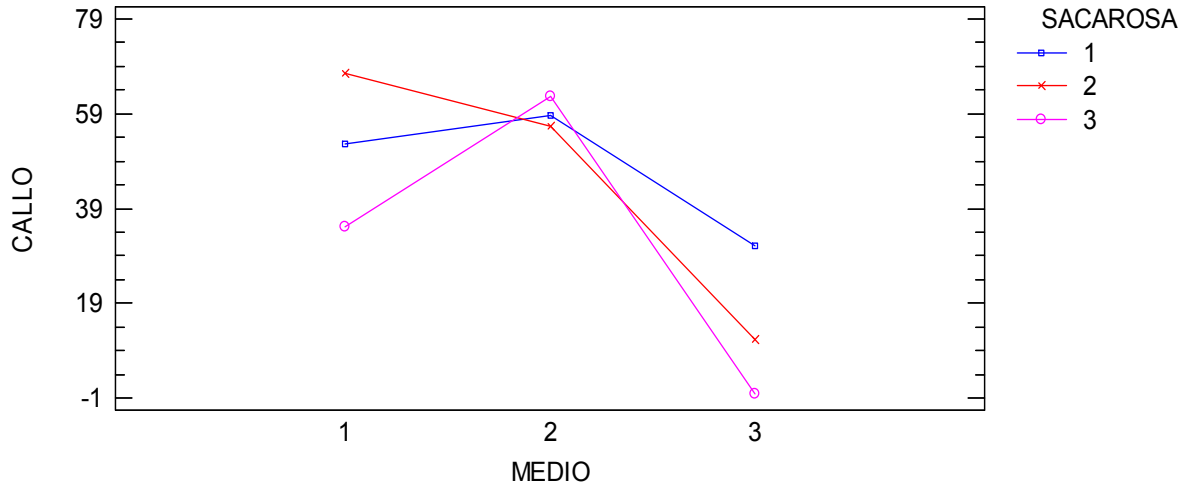


Figura 1. Gráfico de interacciones de tres medios de cultivo y tres concentraciones de sacarosa en la inducción de formación de callo de estevia. Medios: 1) 2,4-D + BAP, 2) 2,4-D + BAP + TDZ y 3) TDZ. Sacarosa: 1) 30, 2) 40 y 3) 60 g L^{-1}.

Además, se observaron varios tipos y coloración del callo, así como el desarrollo de brotes (Figura 2). Cabe señalar que los callos obtenidos en su mayoría mostraron apariencia compacta y de coloración café. No obstante, también fue posible observar características de callo friable y coloración amarilla, verde y cristalina (datos no presentados).

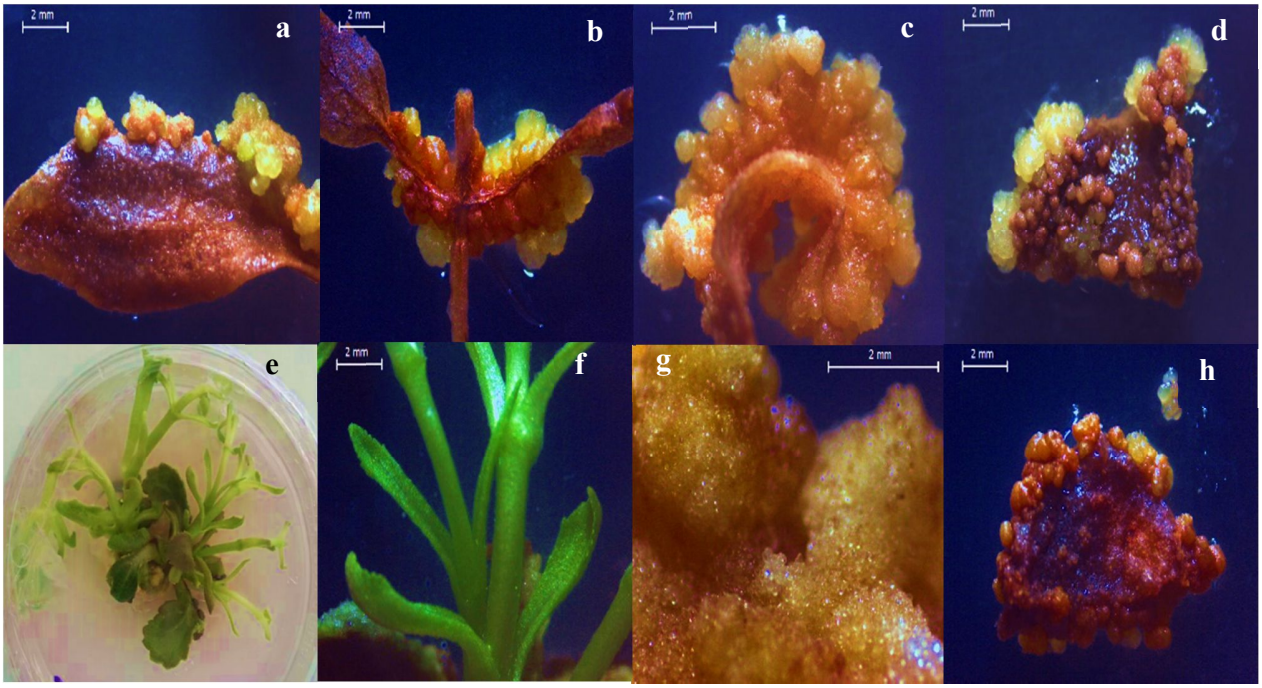


Figura 2. Formación de callo y de brotes en explantes de estevia. Medios adicionados con 2,4-D y TDZ en condiciones de luz: a) 30 y b) 60 g L^{-1} de sacarosa. Condiciones de oscuridad: c) 30 y d) 40 g L^{-1} sacarosa. e) y f) Formación de brotes en el medio con 60 g L^{-1} de sacarosa y TDZ. Condiciones de oscuridad: g) Callo friable en medio con 30 g L^{-1} de sacarosa y TDZ. h) 60 g L^{-1} de sacarosa, 2, 4-D y BAP.

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo constituidos por 2,4-D, BAP y 40 g L^{-1} de sacarosa resultaron más efectivos en la inducción de callo. Sin embargo, para los factores tipo de explante y condiciones de incubación no se observaron diferencias significativas. Por otra parte, se obtuvo organogénesis en los medios con TDZ y en condiciones de luz a los 90 días de cultivo.

REFERENCIAS

[1] N. Megeji, J. Kumar, V. Singh, V. Kaul, P. Ahuja, " Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener," *Curr. Sci. India*, vol. 88, pp. 801-804, 2005.

[2] J. Brandle, A. Richman, A. Swanson, B. Chapman,"Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis," *Plant Mol. Biol*. vol. 50, pp. 613-622, 2002.

[3] M. P. Villa and C. Chifa, "Contribución al comportamiento de la "Yerba dulce" *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) en el Chaco argentino", *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Resumen: A-056, 2006.

[4] L. López and L. Peña, "Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de edulcorantes a base de stevia," *Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana*, 2004.

[5] SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp (accessed 12.12.16).

[6] J. Casaccia, and E. Álvarez, "Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del Ka'A He'E (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Paraguay," *Manual Técnico N°8*, 2006.

[7] F. Toffler and O. A. Orio, "Acceni sulla pin ata tropicale 'Kaa-he-e' ou 'erba dolce'," *Rev. Soc. Sci. Aliment.* vol. 4, pp. 225-230, 1981.

[8] M. Sakaguchi and T. Kan, "Japanese researches on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and stevioside," *Ci. Cult.* vol. 34, pp. 235-248, 1982.

[9] Y. Tamura, S. Nakamura, H. Fukui, M. Tabata, "Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tipculture," *Plant Cell Rep*. vol. 3, pp.183-185, 1984.

[10] E. M. Linsmaier and F. Skoog, "Organic growth factor requirements of tissue cultures," *Plant Physiol.* vol. 51, pp. 100-127, 1967.

[11] J. C. Bespalhok and K. Hattori, "Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* Bertoni floret explants," *Revista Brasilera de Fisiología vegetal* vol. 9, no. 3, pp. 185-188, 1997.

[12] M. Kryvenki, R. G. Kosky, D. Guerrero, M. Dominguez, M. Reyes, " Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos," *Biotecnología Vegetal* vol. 8, no. 2, pp. 91-98, 2008.

[13] E. I. Suárez and A. J. Salgado, "Propagación *In Vitro* de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. *Temas Agrarios* vol. 13, no. 1, pp. 40-48, 2008.

[14] N. Ahmad, H. Fazal, R. Zamir, S. A. Khalil, B. H. Abbasi, "Callogenesis and Shoot Organogenesis from Flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.)," Sugar Tech. vol. 13, no. 2, pp. 174-177, 2011.

[15] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium of rapid growth and essays within tobacco tissue culture," *Plant Physiol*. vol. 15, pp. 573-497, 1962.

[16] F. Toffler and O. A. Orio, "Acceni sulla pin ata tropicale 'Kaa-he-e' ou 'erba dolce'. *Rev. Soc. Sci. Aliment.* vol. 4, pp. 225-230, 1981.

[17] S. M. Jain, "Tissue culture-derived variation in crop improvement," Euphytica vol. 118, pp. 153-166, 2001.

[18] J. C. Bespalhok, J. M. Hashimoto, L. G. E. Vieira, "Induction of somatic embryogenesis from leaf expiants of *Stevia rebaudiana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 5, no. 1, pp. 51-53, 1993.

[19] M. Banerjee, P. Sarkar, "Somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni using different concentration of growth hormones," Int. J. Plant Sci. vol. 5, pp. 284-289, 2009.

[20] M. K. Kim, H. E. Somner, B. C. Bongarten, S. A. Merkle, "High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyls segments of Liquidambar L. by Thidiazuron," *Plant Cell Reports* vol. 16, pp. 536-540, 1997.

[21] B. N. S. Murthy, S. J. Murch, P. K. Saxena, " Thiadiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* vol. 34, pp. 267-275, 1998.

[22] O. Karami, A. Deljou, M. Esna-Ashari, P. Ostad-Ahmadi, "Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)," Sci. Hortic. vol. 110, no. 4, pp. 340-344, 2006.

[23] L. Valverde and V. Villalobos, "Efecto del pH, la luz y la concentración de sacarosa en la embriogénesis somática de cacao (*Theobroma cacao* L.)," *Uniciencia* vol. 17, no. 1, pp. 39-45, 2000.

INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE PODOFILOTOXINA EN UNA LINEA DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Hyptis suaveolens*.

[1] [2]*Bazaldúa, C., [2]Cardoso-Taketa, A. y [2]Villarreal, M.L.

1. Centro de desarrollo de Productos Bióticos- IPN. Ceprobi núm. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Mor., C.P. 62731.
2. Centro de Investigación en Biotecnología - Universidad Autónoma del Estado de Morelos Av. Universidad 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Mor., C.P. 62209.

*Autor para correspondencia: cbazaldua@ipn.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La podofilotoxina es un ciclolignano natural que se utiliza principalmente en la semisíntesis de medicamentos utilizados en quimioterapia. Este lignano se obtiene principalmente de *Podophyllum emodi* especie que crece en el Himalaya y se encuentra en peligro de extinción. El cultivo de raíces transformadas es una alternativa biotecnológica para la que la producción de podofilotoxina (PTOX). *Hyptis suaveolens* es un arbusto silvestre de distribución cosmopolita que se encuentra en varios estados de la República Mexicana y se utiliza para tratar problemas digestivos y otras enfermedades. Se ha reportado que esta planta acumula PTOX en sus raíces. En este trabajo se seleccionó una línea de raíces transformadas de *H. suaveolens* para incrementar la producción de PTOX. Los criterios de selección fueron velocidad de crecimiento, transformación genética, citotoxicidad y producción de PTOX. La comprobación genética se realizó al observar fluorescencia. La citotoxicidad se evaluó mediante el método de la sulforodamina B. La identificación de PTOX se realizó mediante HPLC. La acumulación de PTOX se incrementó hasta en 7 veces. El objetivo de este trabajo fue seleccionar una línea de raíces transformadas productora de PTOX para optimizar su producción mediante modificaciones del medio de cultivo y del método de extracción.

Palabras clave*: Hyptis suaveolens*; Raíces transformadas; Podofilotoxina.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es la primera causa de mortalidad en el mundo y la segunda en el continente americano [1]. Las estrategias de control de esta enfermedad incluyen la cirugía, radioterapia y quimioterapia. El Etopósido, Tenipósido y Etopophos son medicamentos utilizados en la quimioterapia que se obtienen por semisíntesis a partir de la podofilotoxina (PTOX). La principal fuente de PTOX es *Podophyllum hexandrum* [2], especie que se encuentra en peligro de extinción [3]. La demanda anual de PTOX es de más de 100 ton/año, pero su producción es de 80 ton/año [4], por lo cual, se hace necesaria la búsqueda de nuevas fuentes naturales o de alternativas biotecnológicas para su producción. Una alternativa biotecnológica para la producción de este lignano es el cultivo de raíces transformadas (RT).

Hyptis suaveolens es un arbusto silvestre de distribución cosmopolita que se encuentra en varios estados de la República Mexicana y se utiliza para tratar problemas digestivos y otras enfermedades [5].

Se ha reportado que esta planta produce PTOX [6], que acumula tres veces más PTOX en sus raíces que en el follaje [7] y que algunas líneas de raíces transformadas producen PTOX o sus análogos [8].

En este trabajo se utilizaron explantes nodales de *H. suaveolens* para inducir raíces transformadas mediante infección con la cepa ATCC15834-PTDT de *Agrobacterium rhizogenes*. En total se indujeron 144 raíces putativamente transformadas y se seleccionó una línea de raíces transformadas productora de PTOX para incrementar su producción. La comprobación genética se realizó al observar fluorescencia roja por la expresión de la treonina desaminasa del tomate (TDT) y la identificación de PTOX se realizó mediante HPLC.

Con la metodología utilizada la cuantificación de PTOX se incrementó hasta en 7 veces. El objetivo de este trabajo fue seleccionar una línea de raíces transformadas productora de PTOX para optimizar su producción mediante optimización del medio de cultivo y del método de extracción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

A partir de plantas previamente germinadas *in vitro* se obtuvieron explantes de 3 cm de longitud y se colocaron en frascos de Gerber con medio de cultivo MS [9] sin hormonas, suplementado con sacarosa al 3 % y fitagel 2.5 $g \cdot L^{-1}$. Se mantuvieron en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) con luz blanca a una intensidad de 0.285 $W \cdot m^{-2}$ y una temperatura de 24 ± 2 °C. Posteriormente esas plántulas fueron utilizadas como fuente de explantes para inducir las raíces transformadas.

Inducción de raíces transformadas de H. suaveolens

La inducción de raíces transformadas se logró mediante la infección de segmentos nodales con la cepa ATCC 15834-pTDT de *A. rhizogenes*. Se evaluó la eficiencia de transformación genética. Los explantes infectados se dejaron en las mismas condiciones de luz y temperatura previamente descritas

Cultivo y selección de raíces transformadas

Las raíces inducidas se colocaron en cajas de Petri con medio MS con vitaminas de medio Gamborg's (MSB5, Sigma), suplementado con sacarosa (3 %) y fitagel (2.5 $g \cdot L^{-1}$), a los 45 días fueron transferidas a medio de cultivo (MSB5) líquido y se mantuvieron en agitación a 110 RPM en condiciones de luz constante.

Evaluación del medio de cultivo y del método de extracción.

Los medios de cultivo evaluados fueron Murashige and Skoog (MS), MS con vitaminas de Gamborg's (MSB5) y Gamborg's (B5). En experimentos previos se observó que la concentración del medio a la que mejor se desarrollaban las raíces transformadas de *Hyptis sauveolens* fue al 75 %, por lo cual esa fue la concentración evaluada en cada caso, y los tres medios fueron complementados con sacarosa al 3 %. El tiempo de evaluación fue de 45 días. Las raíces transformadas se mantuvieron en agitación constante bajo las mismas condiciones de luz y temperatura ya descritas. Los parámetros evaluados fueron: peso fresco, peso seco y cuantificación de PTOX.

Se ha demostrado que el método de extracción es determinante en el tipo y cantidad de PTOX o sus análogos extraídos en diferentes especies [10]. Por lo que después de varios experimentos se decidió

comparar la cuantificación de PTOX en extractos obtenidos con dos métodos de extracción: 1) extracción clorofórmica y 2) una modificación del método descrito por Koulman [11].

El método descrito consiste en colocar 100 mg de peso seco de muestra en 2 mL de metanol al 80 % (v/v) y sonicar durante una hora, agregar 4 mL de diclorometano y 4 mL de agua, agitar en vórtex, centrifugar a 1000 g durante 5 min. Recuperar fase orgánica y dejar evaporar en campana de extracción, resuspender en metanol y filtrar (tamaño de poro de 45 micras), para ser utilizado en las pruebas de HPLC).

La modificación consistió en sonicar a 40 ± 5 °C, sin embargo para evitar confusiones en lo sucesivo esta modificación se habrá de referir como extracción metanol-diclorometano modificado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción, Cultivo y Selección de raíces transformadas

La comprobación de la transformación genética se realizó al observar la fluorescencia roja por la expresión de la treonina desaminasa del tomate (TDT) [8]. La velocidad de crecimiento no se puede considerar como una prueba irrefutable de la transformación genética, no obstante, en este trabajo se pudo observar que sólo las raíces transformadas lograron sobrevivir en el medio de cultivo líquido sin hormonas y en agitación. Por lo cual, la sobrevivencia y la velocidad decrecimiento fueron asumidas como la primera prueba indirecta de la transformación genética. La eficiencia de transformación con la cepa de *Agrobacterium rizogenes* utilizada fue de 60 %. En total se indujeron 144 raíces putativamente transformadas, de las cuales se seleccionó la línea en la que la cuantificación de PTOX fue mayor.

Identificación y Cuantificación de Podofilotoxina mediante HPLC.

La identificación de PTOX se realizó mediante un equipo de HPLC (Waters. Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, Ma) equipado con un detector de fotoarreglo de diodos (Waters W996). El Software de análisis utilizado fue Millenium 32 (Waters). La columna utilizada fue Zorbax Eclipse RP C18 (150mm x 46mm x 5µm). La fase móvil consistió en una elusión isocrática con metanol-acetonitrilo-agua (20:30:50) y un flujo de 0.8 mL min^{-1}.

Para cuantificar la concentración de PTOX se realizó una curva de calibración con 5 puntos (por triplicado) en concentraciones de 1.95 – 31.25 µg·mL^{-1} (figura 1). Las áreas (máxima y mínima) de los picos correspondientes a PTOX, en los extractos analizados, corresponden a los valores medios de la curva de calibración.

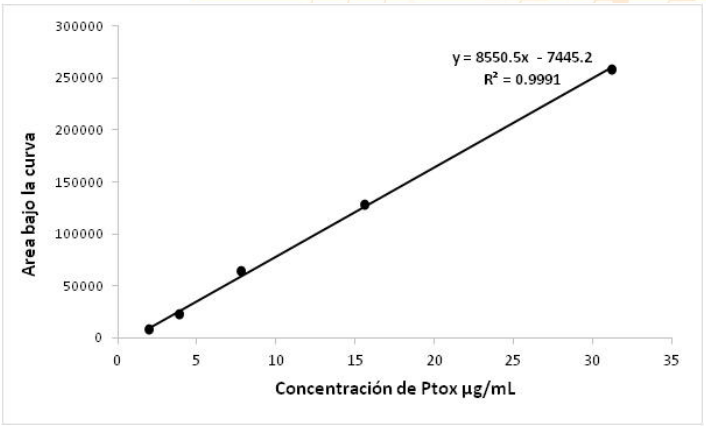


Figura 1. Curva de calibración de Ptox

Efecto del medio de cultivo en el incremento de biomasa y la concentración de PTOX.
La producción de biomasa (peso fresco y peso seco) no fue significativa entre los medios de cultivo MS y MSB5 (P <0.05), pero si fue significativa entre los dos anteriores con el medio de cultivo B5 (figura 2). Al comparar los medios de cultivo NB, WP, MS y B5, Mehrotra reportó que las raíces transformadas de *Glycyrrhiza glabra* tuvieron un mejor desarrollo en el medio de cultivo NB seguido de MS y B5 [12]. Por otro lado, se ha reportado que el medio de cultivo más adecuado para la producción de PTOX es el medio B5 [13].

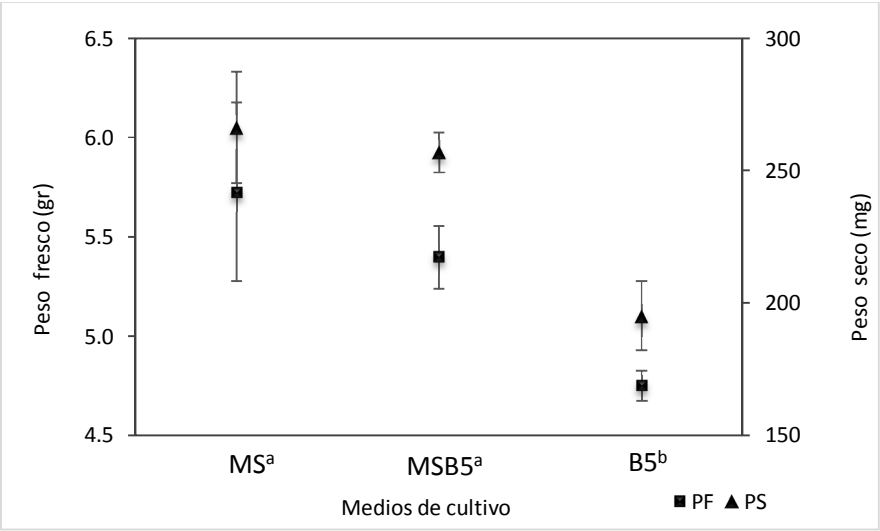


Figura 2. Producción de biomasa de raíces transformadas de *Hyptis suaveolens* en función del medio de cultivo. La evaluación fue realizada a los 45 días de cultivo. Los valores representan el promedio de tres repeticiones y las barras indican la desviación estándar. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Tukey, P < 0.05)

La producción de biomasa (peso fresco y peso seco) no fue significativa entre los medios MS y MSB5, pero si lo fue con el medio B5. Sin embargo, con relación a la cuantificación de PTOX, en los extractos

clorofórmicos la diferencia entre los medios MS y MSB5 si es significativa (tabla 1). En esos extractos la máxima cuantificación de PTOX fue en raíces desarrolladas en medio MS (1.52 mg·g^{-1} PS), seguida de MSB5 y B5 (0.63 y 0.58 mg·g^{-1} PS respectivamente). Por otro lado, en los extractos obtenidos con el método metanol-diclorometano modificado, la cuantificación de PTOX se incrementó de manera diferencial. En esos extractos la mayor cuantificación se observó en MSB5 (4.50 mg·g^{-1} PS), el incremento con respecto a la extracción clorofórmica fue de 7 veces (tabla 1); con ese método de extracción, la cuantificación en MS se duplicó y en B5 se quintuplicó (con respecto a la extracción clorofórmica).

Tabla 1. Concentración de PTOX (mg·g^{-1} PS) calculada en función del medio de cultivo y método de extracción.

Medio de cultivo	Método de extracción	
	Clorofórmica	Metanol-diclorometano modificado
MS	1.52 ± 0.016 [a]	2.89 ± 0.033 [b]
MSB5	0.63 ± 0.013 [b]	4.50 ± 0.032 [a]
B5	0.58 ± 0.005 [b]	3.24 ± 0.039 [b]

Los valores representan la media de tres repeticiones y la desviación estándar. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Tukey, $P < 0.05$)

Para identificar PTOX en los diferentes extractos, se consideró el tiempo de retención y el espectro de máxima absorción del estándar (Podofilotoxina Sigma®) (figura 3). La lectura se hizo a 290 nm.

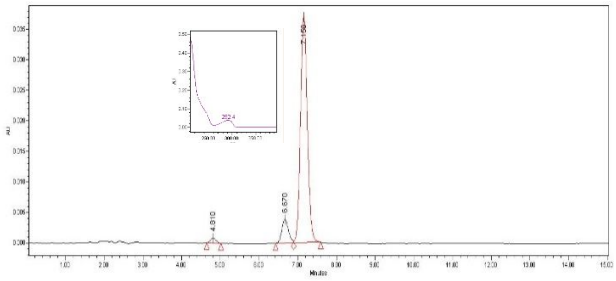


Figura 3. Cromatograma correspondiente al estándar (podofilotoxina, Sigma®). Se muestra el espectro de máxima absorción y el tiempo de retención del pico correspondiente a PTOX (7.15 min)

El incremento en la cuantificación de PTOX dependiendo del medio de cultivo y método de extracción, se puede observar de manera gráfica en la figura 4, donde se sobreponen los cromatogramas de los extractos (clorofórmico y metanol-diclorometano modificado).

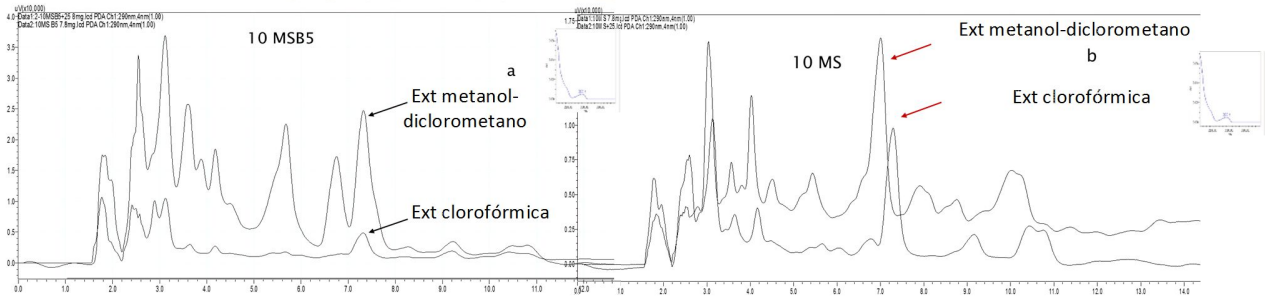


Figura 4. Cromatogramas sobrepuestos de dos métodos de extracción (cloroformo y metanol-diclorometano modificado), en dos medios de cultivo; a) MSB5 y b) MS. Las flechas indican el pico correspondiente a PTOX. También se muestran los espectros de máxima absorción.

CONCLUSIONES

En raíces transformadas de *Hyptis suaveolens* el medio de cultivo no afecta significativamente la producción de biomasa, pero es determinante en la cuantificación de podofilotoxina. El método de extracción es determinante en la cuantificación de podofilotoxina.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento al proyecto 222714 Ciencia Básica. Al IPN por el financiamiento al proyecto SIP20172255.

REFERENCIAS

[1] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer Statistics, 2017," *CA Cancer J Clin*, vol. 67, pp. 7–30, 2017.

[2] A. Giri and M. Lakshmi Narasu, "Production of podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum*: A potential natural product for clinically useful anticancer drugs," *Cytotechnology*, vol. 34, no. 1–2, pp. 17–26, 2000.

[3] R. R. J. Arroo, A. W. Alfermann, M. Medarde, M. Petersen, N. Pras, and J. G. Woolley, "Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans," *Phytochemistry Reviews*, vol. 1, no. 1. pp. 27–35, 2002.

[4] M. A. Alam, P. K. Naik, and G. P. Mishra, "Congruence of RAPD and ISSR markers for evaluation of genomic relationship among 28 populations of *Podophyllum hexandrum* Royle from Himachal Pradesh, India," *Turk. J. Botany*, vol. 33, no. 1, pp. 1–12, 2009.

[5] V. K. Prince, S.P.; Ram, R.K.; Anurag, C.; Dinesh, G.; Sharma, "*Hyptis suaveolens* (L.) poit: A phyto-pharmacological review," *Int. J. Chem. Pharm. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 2013.

[6] E. Lautié, R. Quintero, M. A. Fliniaux, and M. L. Villarreal, "Selection methodology with scoring system: Application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 120, no. 3, pp. 402–412, 2008.

[7] R. a Velóz, A. Cardoso-Taketa, and M. L. Villarreal, "Production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated *in vitro*.," *Pharmacognosy Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 93–102, 2013.

[8] C. Bazaldúa, A. Cardoso-taketa, J. Arellano, B. Camacho-, E. Ventura-zapata, and M. L. Villarreal,

"Podophyllotoxin-Like Lignans Production through Hairy Roots of *Hyptis suaveolens*," *J. Chem. Biol. Phys. Sci.*, vol. 4, no. 5, pp. 37–47, 2014.

[9] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiol. Plant.*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497, 1962.

[10] S. Renouard, T. Lopez, O. Hendrawati, P. Dupre, J. Doussot, A. Falguieres, C. Ferroud, D. Hagege, F. Lamblin, E. Laine, and C. Hano, "Podophyllotoxin and deoxypodophyllotoxin in juniperus bermudiana and 12 other juniperus species: Optimization of extraction, method validation, and quantification," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 15, pp. 8101–8107, 2011.

[11] A. Koulman, M. E. Kubbinga, S. Batterman, H. J. Woerdenbag, N. Pras, J. G. Woolley, and W. J. Quax, "A phytochemical study of lignans in whole plants and cell suspension cultures of Anthriscus sylvestris," *Planta Med.*, vol. 69, no. 8, pp. 733–738, 2003.

[12] S. Mehrotra, A. K. Kukreja, S. P. S. Khanuja, and B. N. Mishra, "Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of Glycyrrhiza glabra in bioreactor," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 2, 2008.

[13] A. Baldi, A. K. Srivastava, and V. S. Bisaria, "Improved podophyllotoxin production by transformed cultures of Linum album," *Biotechnol. J.*, vol. 3, no. 9–10, pp. 1256–1263, 2008.

REFERENCIAS

[1] NIH INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER, «ESTADÍSTICAS DEL CÁNCER,» 22 Marzo 2017. [En línea]. Available: https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas. [Último acceso: 21 Junio 2017].

[2] M. L. N. Giri Archana, "Production of podophyllotoxin from podophyllum hexandrum: a potential natural product for clinically useful anticancer drugs," Cytotechnology, vol. 34, no. 1, pp. 17-26, 2000.

[3] A. A. M. M. P. M. P. N. W. J. Arroo RRJ, «Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans,» Phytochemistry Review, vol. 1, pp. 27-35, 2002.

MICROALGAS AISLADAS DE GRANJAS PORCINAS PARA LA REMOCIÓN DE ORTOFOSFATO Y AMONIO DE AGUAS RESIDUALES.

[1]Galicia-Campos, S.C., [2]Salcedo-Martínez, S.M., [3]Aldama-Aguilera, C., [1]Vidales-Contreras, J.A., y [1]García-Gómez, C.

1. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, C.P. 66455.
2. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, C.P. 66455.
3. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ingeniería, C.P. 78000.

*Autor para correspondencia: cecy_cat3@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Las actividades humanas, particularmente la agricultura y la urbanización han provocado el incremento de nitrógeno y fosforo en cuerpos de agua superficiales, provocando eutrofización, que poner en peligro la salud humana, la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas. Una alternativa en la solución de este problema, es el uso de microalgas, cultivadas en aguas residuales y escorrentía agrícola para asimilar el exceso de nutrientes del agua para su uso posterior. La presente investigación reporta el uso de microalgas nativas de Marín N.L. aisladas de agua residual porcícola, colocadas en matraces Erlenmeyer de 500 mL con medio bristol modificado para la remoción de ortofofato y amonio. Se aislaron e identificaron cuatro cepas de microalgas a partir de agua residual obtenida de una granja porcina, correspondientes a *Scotiellopsis sp, Neochloris sp, Trachelomonas volvocina y Acutodesmus dimorphus.* Todas las cepas aisladas fueron capaces de remover ortofosfato y amonio. *A. dimorphus* resultó ser la más eficiente en la remoción de ortofosfato y amonio con 82.7 y 85.2% respectivamente, mientras que *T. volvocina* obtuvo los porcentajes de remoción más bajos, 56.2% para ortofosfato y 68.8% para amonio. Cuando se evaluaron en pares, la interacción que presentó la remoción más alta fue *Neochloris sp* con *Acutodesmus dimorphus* con 67.7% para ortofosfato y un 66.1% para amonio. Los cultivos en pares obtuvieron menores porcentajes de remoción que las cepas individuales, debido probablemente a la competencia por nutrientes y capacidad de adaptación. Por otro lado, en las observaciones realizadas al microscopio, el número de células de *Scotiellopsis sp* disminuyó a tal grado que, al final del ensayo en duplas, era difícil encontrarlas, por lo que se asume un posible antagonismo. El desempeño de la comunidad, es decir de las cuatro microalgas, logró el porcentaje de remoción más alto para ortofosfatos (87%) y el segundo más alto para amonio (83.6%). Es posible que esta alta cantidad de remoción fuese influenciada por las cepas *Acutodesmus dimorphus y Neochloris sp* quienes de forma individual tuvieron los porcentajes más altos de remoción y que además presentaron la más rápida adaptación al medio.

Palabras clave: Aislamiento de microalgas; cultivo; remoción de nutrientes; tratamiento de agua residual.

INTRODUCCIÓN

Las actividades pecuarias tienen un impacto significativo en prácticamente todas las esferas del medio ambiente, incluidos el cambio climático y el aire, la tierra y el suelo, el agua y la biodiversidad [1].

Entre 1990 y 2005, la producción porcina en México incrementó en 50% y para el año 2009 se criaban y sacrificaban más de 15 millones de cerdos anualmente para el consumo humano, siendo Jalisco, Sonora, Yucatán y Guanajuato, los principales estados productores de cerdo en el país [2].

Los lechones, destetes y hembras lactantes excretan cerca de 8% de su peso vivo por día; los cerdos en crecimiento y finalización excretan cerca del 7%; sementales y hembras gestantes y secas, que son animales que tienen un acceso limitado al alimento, excretan diariamente cerca de 3% de su peso vivo.
La información sobre la tasa de excreción de los cerdos solo es confiable cuando se han obtenido numerosas muestras. En México, este tipo de muestreo exhaustivo nunca se ha realizado; por lo tanto, para los cálculos de ingeniería utilizados en el diseño de sistemas de tratamiento, se emplea un promedio de varias fuentes que es de 6.17 Kg de heces y orina por día por unidad de producción animal (6.1711 00 Kg de peso vivo) [2].

En aguas residuales de granjas porcinas las cantidades de amonio varían entre 4.49 a 790 mg/L y las de ortofosfato entre 49 y 895 mg/L [3].

La determinación del efecto ambiental de los desechos porcinos incluye, además de las repercusiones directas de los desechos sobre los recursos como agua, suelo y aire, factores de perturbación como olores y plagas de insectos, además de efectos indirectos sociales, políticos e incluso estéticos que son imposibles de cuantificar [2].

Los animales de producción requieren de agua para su hidratación, y se necesita cada vez más agua, especialmente en las instalaciones industriales, para limpiar los recintos (por ejemplo, jaulas, establos, corrales), para desechar los residuos y para enfriar a los animales. El procesamiento de productos animales también requiere de grandes volúmenes de agua y puede generar grandes cantidades de aguas de desecho [1].

Entre las soluciones más atractivas se encuentran los tratamientos biotecnológicos que emulan los fenómenos que ocurren espontáneamente en la naturaleza, como los lagunares, estanques, sistemas de infiltración, humedales artificiales, microorganismos, entre otros [4].

La biotecnología consiste en hacer que los organismos trabajen en nuestro beneficio mediante un conjunto de técnicas que, combinadas con el conocimiento de la biología de los seres vivos, orienta la vida de éstos hacia procesos de interés económico-social para la humanidad. La biotecnología de las algas se ha enfocado principalmente hacia las algas microscópicas y consta principalmente de dos fases: producción controlada de la biomasa algal y aprovechamiento de dicha biomasa [5].

Actualmente, uno de los géneros de microalgas más utilizados es *Chlorella*. Este género ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo y metales, así como la reducción de la demanda química de oxígeno [6].

Las microalgas no solo transforman los compuestos, sino son capaces de integrar los elementos en sus biomoléculas, asimilando una cantidad significativa de nutrientes como nitrógeno y fósforo, que requieren en una alta cantidad para la síntesis de proteínas (45-65% de su peso seco), ácidos nucleicos, fosfolípidos. Esto hace a las microalgas candidatos óptimos para la biorremediacion de aguas residuales porcinas [7].

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de trabajo.

Las microalgas fueron recolectadas en una Granja Porcina ubicada en la Facultad de Agronomía de la UANL en, Marín, N.L. La experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, laboratorio de Botánica de la UANL, San Nicolás de los Garza, N.L.

Obtención de las muestras de algas

Se tomaron 600 L del desagüe de una granja porcina con cuarenta cabezas de marranos de engorda. Dicha muestra fue homogeneizada, filtrada y vertida en palanganas de plástico de 60 cm de diámetro y 25 cm de profundidad, para formar microlagunas. Se utilizaron seis palanganas a las que se les agregó agua residual en tres concentraciones, dos al 100% (60 L de agua residual), dos al 50% (30 L agua residual, 30 L de agua de la llave) y dos al 25% (15 L agua de residual 45 L agua de la llave) y se inoculó con suelo obtenido de los canales de desagüe de las granjas.

Las palanganas se dejaron destapadas, para que tuvieran contacto con aves y atmósfera. Posteriormente, se tomaron 50 mL de muestra de cada una de las concentraciones a los 7, 14 y 21 días.

Aislamiento y cultivo de microalgas

A partir de las muestras recolectadas en las microlagunas se aislaron cuatro cepas de microalgas. Mediante dilución, cultivo en placa y cultivo continuo en matraces Erlenmeyer de 500 mL.

En tubos de ensayo de 8 mL se colocó un mililitro de cada una de las concentraciones muestra de las microlagunas y 5 mL de medio Bold o Medio Bristol.

Después de 7 a 14 días, tiempo en que los cultivos se comenzaron a tornar verdes, se realizaron diluciones en microplaca, para aislar las poblaciones y realizar su cultivo en cajas Petri con medio Bristol con antibiótico y antifúngico, solidificado con agar y cultivo contenido en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con Iluminación con lámparas fluorescentes (200 W) a 400 µmol fotones $m^{-2}s^{-1}$y bombeo constante de aire estéril a razón de 2800 cm^3 min^{-1}, sin agitación, a una temperatura de 24°C.

Conteo de algas

Los conteos de algas se realizaron en una cámara de Neubauer siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron conteos de algas por cepa a los 0, 7, 14, 21 y 26 días de cultivo, para determinar su cinética de crecimiento en un cultivo continuo.

Identificación taxonómica

Las algas fueron identificadas mediante su morfología y características anatómicas. De acuerdo a las técnicas de laboratorio, descritos por Sime (2004) editado por Whitton y Brook y Jhon (2003) editado por Wehr y Sheath. Entre otras fuentes se utilizaron las claves especializadas para género de Bourrelly

(1966, 1968, 1979); Smith (1950) y Wher y Sheath (2003) y para especie los trabajos de Tifany y Britton (1952), Ortega (1984) y Whitford y Schumacher (1984).

Medición de Ortofosfato y Amonio

El ortofosfato y amonio se determinaron mediante un fotómetro de la marca Hanna (Hanna Instruments multiparameter photometer HI 83225) y los reactivos HI93706-A Y -B para ortofosfato y los HI9371-03 y -01 para amonio. La temperatura y pH se determinaron con una precisión de ±0.1 unidades, mediante un termómetro sumergible y un potenciómetro Eco Testr pH2 de Eutech Instruments, respectivamente.

Las mediciones de ortofosfato y amonio se realizaron por triplicado. Las muestras para las mediciones se obtuvieron de matraces Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 400 mL de medio Bristol modificado (tabla 2) e inoculados con 100 mL de uno de los cultivos de algas de 15 días (o una parte proporcional de los mismos en las combinaciones: 50 mL de cada cultivo en los ensayos con dos algas y 25 mL de cada uno en el ensayo con cuatro algas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación taxonómica

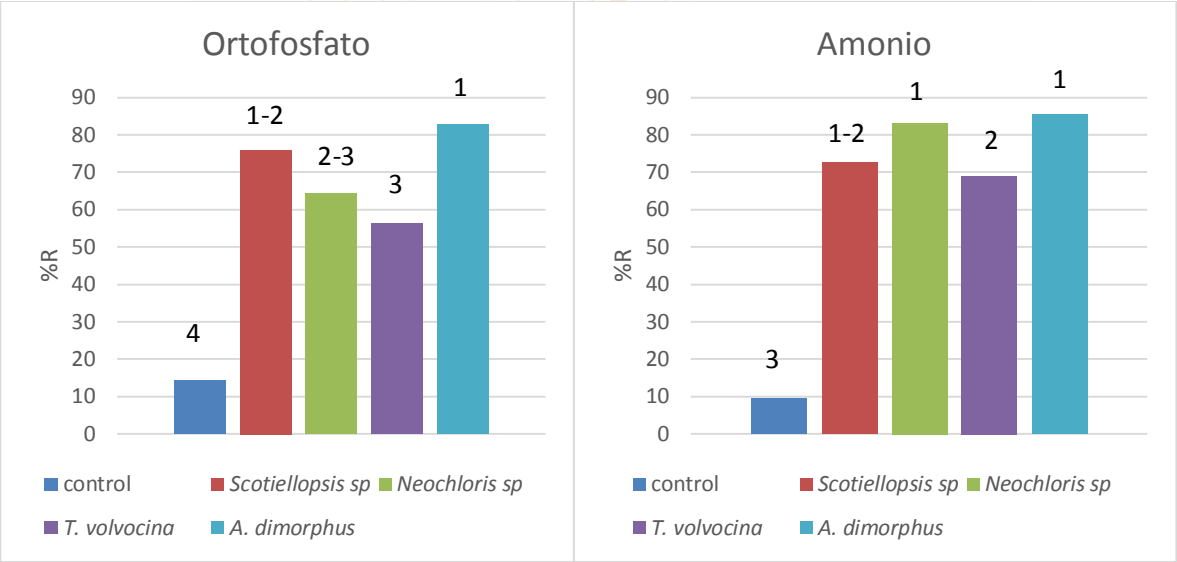
De los aislados realizados a partir de las microlagunas con agua residual proveniente de una granja porcina, se identificaron cuatro géneros, dos de ellos se llevaron a especie. Se identificaron cuatro cepas de microalgas a partir de agua residual obtenida de una granja porcina, correspondientes a *Scotiellopsis sp, Neochloris sp, Trachelomonas volvocina y Acutodesmus dimorphus.*

Porcentaje de remoción

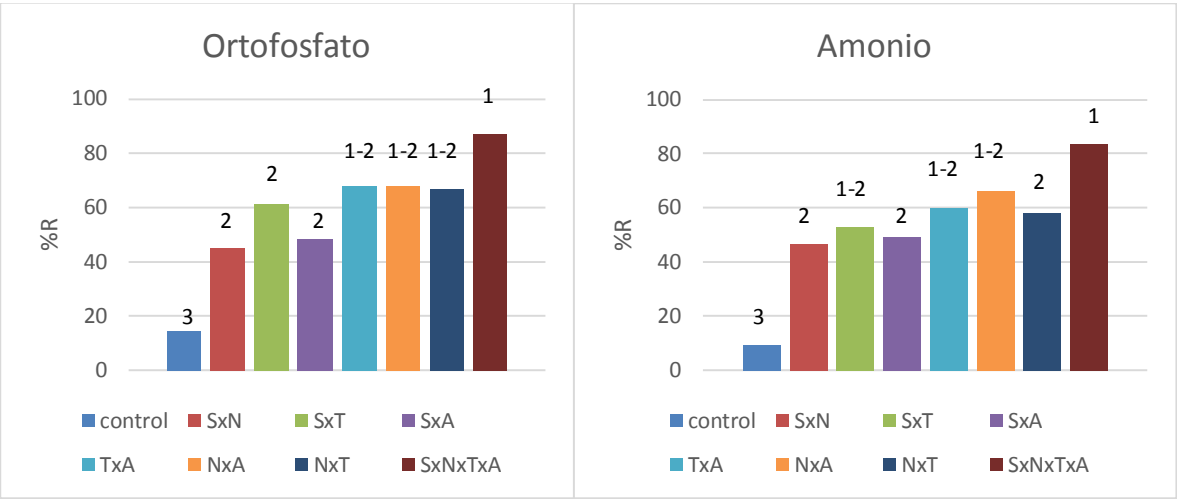
Se calculó del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio a los 20 días, mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = [(\mathrm{Ci} - \mathrm{Cf}) \div \mathrm{Ci}] \times 100$$

Dónde:
%R: Porcentaje de remoción
Ci: Concentración inicial
Cf: Concentración final



1. Ensayo con cepas individuales para remoción de ortofosfato y amonio.



2. Ensayo con cepas en dupla y cuádruple.

Graficas de remoción. Porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por las cepas individuales (1) y duplas y cuádruples (2). Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

En las gráficas se puede observar que para ortofosfato en los ensayos individuales (1), quien tiene la remoción más alta es *A. dimorphus*, pero no es significativamente distinto a *Scotiellopsis sp*, seguidas por *Neochloris sp* y *T. volvocina*. Mientras en el ensayo de duplas y cuádruple, la interacción entre las cuatro cepas resulto ser la mejor, colocándose en el grupo uno, seguida por es NxT, NxA y TxA. En la remoción de amonio, de manera individual, *A. dimorphus* y *Neochloris sp* quedaron en el mismo grupo con los porcentajes de remoción más altos. Para el ensayo de duplas y cuádruple la interacción entre las cuatro cepas obtuvo la remoción más alta, quedando en el grupo uno, seguida por las interacciones entre NxT, NxA y TxA. Por lo tanto, puede distinguirse que las mejores cepas, tanto individuales como en

interacciones, son *A, dimorphus y Neochloris sp*, por su constante aparición en los grupos con mayor remoción.

Tabla 1. Porcentajes de remoción para ortofosfato y amonio, inoculo y concentración inicial de microalgas y nutrientes.

Cepas	Inoculo	PO_4^{3-} (mg/L)	NH_4 mg/L	Días	% de remoción PO_4^{3-}	% de remoción NH_4
Chlorella vulgaris [1] (aislada)	1.23x10[1]o	10	25	20	45	36
Spirulina subsalsa [1] (aislada)	8 filamentos	10	25	20	24	26
(Mixto) *Chlorella* sp *Scenedesmus* sp *Chlamydomonas* sp [1] (aisladas)	12.3 x 109	10	25	20	76	68
Algas filamentosas verde-azules [2] (aisladas)	1200 mL	8.8 +- 0.9	39.4 +- 5.5	14	54	89
Chlorella vulgaris [3] (cepa de colección)	1 g/L	4.04 mg	11.30	8	44.8	96.9
Chlorella vulgaris [4] (cepa de colección)	140 mg/L	0.68	24	7	78.5	63.6
Scotiellopsis sp	$1.5x10^7$	10± 1	20± 1	20	75.8	72.4
Neochloris sp	$1x10^7$	10± 1	20± 1	20	64.2	83.0
Traquelomonas volvocina	$2x10^7$	10± 1	20± 1	20	56.2	68.8
Acutudesmus dimorphus	$1.5x10^7$	10± 1	20± 1	20	82.7	85.2
(mixto) Scotiellopsis sp y Neochloris sp	$7.5x10^6$ - $5x10^6$ células	10± 1	20± 1	21	45.1	46.6
(mixto) Scotiellopsis sp y Trachelomonas volvocina	$7.5x10^6$ - $1x10^7$	10± 1	20± 1	21	61.2	52.9

(mixto) Scotiellopsis sp y Acutodesmus dimorphus	$7.5x10^6$ - $7.5x10^6$	10± 1	20± 1	21	48.3	49.1
(mixto) Trachelomonas volvocina y Acutodesmus dimorphus	$1x10^7$ - $7.5x10^6$	10± 1	20± 1	21	67.7	60
(mixto) Neochloris sp y Acutodesmus dimorphus	$5x10^6$ - $7.5x10^6$	10± 1	20± 1	21	67.7	66.1
(mixto) Neochloris sp y Trachelomonas volvocina	$5x10^6$ - $1x10^7$	10± 1	20± 1	21	67.7	60
(mixto) Scotiellopsis sp, Neochloris sp, Trachelomonas volvocina y Acutodesmus dimorphus	$3.7x10^6$-$2.5x10^6$-$5x10^6$-$3.7x10^6$ células.	10± 1	20± 1	21	87	83.6

([1][8]); [2][9]; [3][10]; [4][11])

En la Tabla 1 se puede observar como en previas investigaciones se ha trabajo tanto con microalgas de colección y aisladas, en diferentes tipos de concentración para ortofosfato y amonio, así como diferente inoculo, por tanto es evidente que estos factores (concentración de nutrientes e inoculo de microalgas) son cruciales para obtener cierto porcentaje de remoción, se sabe que el fósforo es primordial para el crecimiento de las algas, pues puede limitar su crecimiento si no está disponible en las cantidad suficiente y una baja concentración de fósforo está relacionada con una densidad baja de células (Graham y Wilcox, 2000). Por otro lado los porcentajes de remoción más altos se observan en la remoción de amonio, tal vez debido a la capacidad que tienen algunas microalgas, llamada "luxury consumption" que consiste en tomar nitrógeno en exceso presente en el ambiente para después utilizarlo si es requerido [12].

CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron cuatro cepas de microalgas a partir de agua residual obtenida de una granja porcina, correspondientes a *Scotiellopsis sp, Neochloris sp, Trachelomonas volvocina y Acutodesmus dimorphus.*

Todas las cepas aisladas fueron capaces de remover ortofosfato y amonio. *A. dimorphus* resultó ser la más eficiente en la remoción de ortofosfato y amonio con 82.7 y 85.2% respectivamente, mientras que *T. volvocina* obtuvo los porcentajes de remoción más bajos, 56.2% para ortofosfato y 68.8% para amonio.

Cuando se evaluaron en pares, la interacción que presentó la remoción más alta fue *Neochloris sp* con *Acutodesmus dimorphus* con 67.7% para ortofosfato y un 66.1% para amonio. Los cultivos en pares obtuvieron menores porcentajes de remoción que las cepas individuales, debido probablemente a la competencia por nutrientes y capacidad de adaptación. Por otro lado, en las observaciones realizadas al microscopio, el número de células de *Scotiellopsis sp* disminuyó a tal grado que, al final del ensayo en duplas, era difícil encontrarlas, por lo que se asume un posible antagonismo. El desempeño de la comunidad, es decir de las cuatro microalgas, logró el porcentaje de remoción más alto para ortofosfatos (87%) y el segundo más alto para amonio (83.6%). Es posible que esta alta cantidad de remoción fuese influenciada por las cepas *Acutodesmus dimorphus* y *Neochloris sp* quienes de forma individual tuvieron los porcentajes más altos de remoción y que además presentaron la más rápida adaptación al medio.

REFERENCIAS

[1] H. Steinfeld, P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. de Haan, *La larga sombra del ganado problemas ambientales y opcione*, vol. 14, no. 2. 2009.

[2] R. Méndez Novelo, T. Castillo Borges, E. Vázquez Borges, O. Briceño Pérez, V. Coronado Pedaza, R. Pat Canuel, and P. Carrido Vivas, "Estimación del potencial contaminante de las granjas porcinas y avícolas del estado de Yucatán," *Ingeniería*, vol. 13, no. 2, pp. 13–21, 2009.

[3] M. Izaguirre, Z. Ivania, L. Vega, and J. Alejandro, "Estudio de pre factibilidad para el aprovechamiento del biogás con fines energéticos a partir del estiércol de ganado bovino e," 2009.

[4] C. a. Arias and D. H. Brix, "Humedales Artificiales para el tratamiento de agas residuales," pp. 17–24, 2003.

[5] A. Gaitero, "Diseño de un Prototipo de Fotobiorreactor para el Cultivo de ' Spirulina Platensis ,'" *Conama*, p. 25, 2012.

[6] C. Wang, X. Yu, H. Lv, and J. Yang, "Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga Chlorellasp," vol. 34, no. April, pp. 421–425, 2013.

[7] M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani, *<Michael A. Borowitzka (2013). Algae for Biofuels and Energy-Springer Netherlands.pdf>*. .

[8] C. Lozano, "Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados Resumen," vol. 3, no. 1, pp. 80–94, 2012.

[9] Y. Su, A. Mennerich, and B. Urban, "Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios," *Bioresour. Technol.*, vol. 105, pp. 67–73, 2012.

[10] H. Choi and S. Lee, "Effects of Microalgae on the Removal of Nutrients from Wastewater : Various Concentrations of Chlorella vulgaris," vol. 17, pp. 3–8, 2012.

[11] R. Boonchai, G. T. Seo, D. R. Park, and C. Y. Seong, "Microalgae Photobioreactor for Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater of Sewage Treatment Plant," *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.*, vol. 2, no. 6, pp. 407–410, 2012.

[12] K. Larsdotter, *Sammanfattning Som del i en studie där hydroponisk avloppsrening undersökts testades även*. 2006.

[13] K. D. Mahrer, "Some considerations when abstracting," *Geophysics*, vol. 58, no. 1. pp. 10–11, 1993.

[14] M. Weiss and A. M. Newman, "A guide to writing articles in energy science," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 11, pp. 3941–3948, 2011.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE HARINA DE TRITICALE.

[1]*Hernández-Martínez, A., [1]Galicia-García, T., [2]Vega-Ríos, A., [3]Béjar-Hinojosa, M. y [1]Rascón-Cruz, Q.

1. Facultad de Ciencias Quimicas. Universidad Autonoma de Chihuahua. Circuito Universitario s/n. 31123. Chihuahua Chihuahua.
2. CIMAV Chihuahua. Av Miguel de Cervantes Saavedra 120. Complejo Industrial Chihuahua. 31136. Chihuahua, Chihuahua.
3. CIReNa. Antigua Normal Rural SN. 33941. Salaices, Lopez, Chihuahua.

*Autor para correspondencia: angellies.lh@gmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Las grandes cantidades de materiales plásticos que se utilizan para paquetes de alimentos traen consigo graves problemas medioambientales. Solo en México se generan 102.887 toneladas de basura diaria, del cual el 7% son plásticos. Provocando contaminación en suelo, agua, aire y sistemas de drenaje. Dependiendo de su densidad estos plásticos se llegan a degradar en más de 1000 anos. De esta manera es imperativa la búsqueda de materiales alternativos en el desarrollo de plásticos, que provengan de fuentes naturales, renovables, degradables y de alta disponibilidad. El presente trabajo tiene como objetivo la obtención y desarrollo de películas comestibles a base de harina de triticale (Tricosecale Wittmack) por casting así como su caracterización proximal (humedad, extracto etéreo y proteína), fisicoquímica (espesor, solubilidad, densidad, color, aspecto visual), mecánicas (resistencia máxima a la tracción σmax, y elongación ε) y de barrera (permeabilidad al vapor de agua PVA). Se caracterizo la materia prima (harina de Triticale) obteniendo un porcentaje de humedad de 7.82%, extracto etéreo 8.57% y proteína 12%, para posteriormente ser acondicionada para la elaboración de las películas por método casting (Aguirre et al., 2011), en donde se presento una película uniforme sin la presencia de burbujas ni grietas, a espesores en un rango de 0.1 mm a 0.15mm. Mediante el análisis de superficie de respuesta se presento una mayor humedad (47.7%) y solubilidad (1.53%) a altas concentraciones de harina y bajas concentraciones de plastificante, mientras que a bajas concentraciones de harina e intermedios de plastificante se presentaron valores menores de densidad (1.13 g/cm3), esta misma tendencia se obtuvo en el análisis de color en donde se presentaron películas mas translucidas. Para la respuesta de ε se obtuvo un valor de 43.5% a altas concentraciones de harina y almidón, sin embargo al disminuir la concentración de plastificante a niveles intermedios se favorecieron los valores de σmax (22.28 MPa), mientras que a niveles inferiores en cada factor se observo un valor de PVA menor (2.09 g mm/m2h kPa). Se concluye que fue posible la obtención de la película a base de harina de triticale por el método casting en donde la concentración de plastificante influyo en mayor proporción sobre las propiedades mecánicas y de barrera, lo que hace un fuerte potencial para su uso alimenticio como película y cobertura comestible, así como su escalamiento a futuro para la obtención de película para empaque por el proceso de extrusión.

Palabras clave*:* Películas comestibles; Triticale; método casting

REFERENCIAS

[1] Andreuccetti C., Carvalho R.A., Galicia-Garcia T., Martinez-Bustos F., Gonzalez-Nunez R., Grosso CRF. (2012). Functional properties Of gelatin-based films containing Yucca schidigera extract produuced via casting, extrusion and blown extrusion processes. Journal of Food Engineering 113, 33-40.

[2] Aguirre A., Borneo R., Leon A.E. (2013). Properties of triticale flour protein based films. LWT-Food Science and Technology, 44, 1853-1858.

[3] Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: properties enhancement. International Food Research Journal 16:1-9.

MONITORIZACIÓN DE LA PRESENCIA ADVENTICIA DE EVENTOS TRANSGÉNICOS EN ACCESIONES DE ALGODÓN PARA CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO EN BANCO DE GERMOPLASMA.

[1]*Guzmán-Rodríguez, L.F., [1]Pichardo-González, J.M., [1]Cortés-Cruz, M.A., [2]Muñoz-Hernández, J., y [1]García-Muro, A.M.

1. Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Blvd. de la Biodiversidad No. 400, Col. Rancho las Cruces, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. CP. 47600.
2. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. Prolongación de la Avenida Oriente 6 No.1009, Col. Rafael Alvarado. Orizaba, Veracruz. CP. 94340.

*Autor para correspondencia: guzman.luisf@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN
La monitorización de la presencia adventicia de eventos transgénicos contribuye a asegurar la integridad genética de las accesiones que son resguardadas en bancos de germoplasma. En el presente trabajo se estandarizó e implementó la metodología de detección de eventos transgénicos en algodón a conservar en el Centro Nacional de Recursos Genéticos. En el estudio se incluyeron 26 accesiones de semilla de algodón, las cuales se germinaron para obtener plántulas y de ahí obtener los ácidos nucleicos. La detección de eventos transgénicos se realizó por triplicado, mediante amplificación del promotor 35S (p35S) por PCR tiempo real y como control interno se empleó el gen *adh*C de algodón. La detección del p35S se realizó en 78 muestras de DNA de algodón. Una muestra se consideró positiva cuando, en las tres repeticiones, se observaron la curva típica de amplificación y el valor Ct menor a 37. En la monitorización de 26 accesiones no se observó la amplificación del p35S. De tal manera que, no se detectó la presencia adventicia de eventos transgénicos en los materiales de algodón monitorizados en resguardo en el Centro Nacional de Recursos Genéticos, lo que contribuye a asegurar la integridad genética de las accesiones conservadas.

Palabras clave: OGM; promotor 35S; PCR tiempo real; *adh*C; integridad genética.

INTRODUCCIÓN

En las actividades de conservación de los recursos genéticos se requiere, además de, preservar la variabilidad, asegurar la integridad genética de los materiales [1]. Por la naturaleza heterógama de ciertas especies y la introducción al campo de cultivos modificados genéticamente, existe la posibilidad de que, se lleve a cabo la introgresión no intencionada de eventos transgénicos en materiales que, suponemos están libres de organismos genéticamente modificados (OGMs) [2]. Por tal motivo, programas de monitorización de la presencia adventicia de OGMs deben ser llevados a cabo y así, contribuir a asegurar la integridad genética de las accesiones en resguardo [3].

El algodón (*Gossypium hirsutum*) pertenece a la familia de las Malváceas y al género *Gossypium*, el cual está formado por 51 especies [4]. El algodón es cultivo que puede ser fertilizado por polinización cruzada [5]. Por otra parte, se emplea ampliamente en la producción de fibra textil.

Derivado de la demanda de alimentos a nivel mundial y a la declaración por parte de la FAO que menciona que la producción agrícola deberá aumentar un 70% para el año 2050, la biotecnología juega un papel importante para lograr la seguridad alimentaria, pero, las aplicaciones de la biotecnología también son implementadas en cultivos como el algodón, que no son empleados en la nutrición humana, aunque si en la alimentación de animales domésticos como el cerdo. Es por este motivo que se está incrementando sustancialmente el número de cultivos modificados genéticamente [6]. Desde el año 2008 hasta el 2016, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Seguridad Alimentaria (SENASICA) ha concedido el permiso de liberación al ambiente de 590 cultivos transgénicos de maíz, algodón, soya y alfalfa, principalmente, en su mayoría en fase experimental o piloto, pero nueve permisos en fase comercial, delos cuales siete son de algodón y dos de soya [6, 7].

Encontrar las diferencias entre cultivos transgénicos y libres de OGMs a simple vista e incluso a nivel morfológico resulta complicado, por tal motivo, los métodos analíticos son una herramienta útil. Existen diferentes estrategias para detectar la presencia de transgenes, por ejemplo, en los alimentos, mediante cromatografía de gases, se determinan los perfiles de ácidos grasos. Otro enfoque es la identificación de proteínas a través de corrimientos electroforéticos o por inmunoensayo con ELISA. Los métodos más aceptados, específicos y sensibles son los que se basan en el DNA, mediante amplificación por PCR punto final o bien, con el uso de sondas marcadas con fluorescencia en el método con PCR tiempo real. Este último, permite realizar detección cualitativa y cuantificación, además, es el más empleado en los laboratorios dedicados a la monitorización de OGMs [8].

El promotor es un componente del casete transgénico; su función es dirigir la expresión del transgen. El promotor 35S (p35S) del virus del mosaico de la coliflor es el más utilizado en varios cultivos, incluyendo el algodón, por la alta eficiencia observada [9, 10]. De tal manera que, identificarlo en una muestra es indicativo de la presencia de OGM [11].

En el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) se realiza la conservación de la biodiversidad de los recursos genéticos existentes en México que generan valor económico, social y ambiental, para contribuir al uso equitativo, integral y sustentable de dichos recursos en beneficio de las generaciones presentes y futuras, apoyados en el conocimiento científico y tecnología de vanguardia. Por tal motivo, en este trabajo se estableció e implementó la metodología detección de OGMs y se llevó a cabo la monitorización de accesiones de algodón a resguardar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de ácidos nucleicos

En el presente trabajo se incluyeron 26 accesiones de semilla de algodón en resguardo en el CNRG. Las semillas se germinaron para obtener plántulas, se colectaron las hojas y se realizó la pulverización del tejido con mortero, pistilo y nitrógeno líquido.

Los ácidos nucleicos se aislaron mediante el método reportado previamente [12]. Se verificaron la concentración y pureza por espectrofotometría, la integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed y la funcionalidad por amplificación del gen *rbc*L por PCR punto final [13].

Detección del promotor 35S

La detección de la presencia adventicia de eventos transgénicos se realizó por triplicado, mediante amplificación del promotor 35S (p35S) usando una sonda marcada con el fluoróforo FAM por PCR tiempo real. Además, en la reacción de PCR se incluyó la amplificación del gen interno de algodón *adh*C, como control interno, para el cual se usó la sonda marcada con el fluoróforo HEX.

La mezcla de reacción se realizó con el método comercial Fast Universal Master Mix y los oligonucleótidos reportados previamente [14], en un volumen de 20 µL. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo a un reporte previo [14]. Además, en cada ensayo se incluyeron controles positivos, negativos y sin templado. Los resultados se analizaron de manera visual en la gráfica de amplificación y se verificaron los valores Ct.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección del p35S se realizó en 78 muestras de DNA de algodón. El ensayo fue válido al observarse en la gráfica, amplificación del gen interno *adh*C en los controles positivos y negativos, amplificación del p35S en los controles positivos y sin línea típica de amplificación en el control sin templado.

La curva típica de amplificación está formada por las etapas basal, exponencial y meseta. Por otra parte, el Ct es el ciclo en el cual comienza la etapa exponencial, el cual está determinado por la intercepción de la curva de amplificación con la línea del umbral. El umbral es la línea paralela al eje de las abscisas, hay un umbral para cada blanco y se considera que, cualquier fluorescencia detectada por debajo no representa amplificación. Una muestra se consideró positiva cuando en las tres repeticiones se observaron la curva típica de amplificación y el valor Ct menor a 37.

En el análisis de 78 muestras de DNA en la gráfica, no se observó amplificación del p35S en alguna de las muestras (**Figura 1**). Esto significa que, en la monitorización por triplicado de 26 accesiones de algodón no se detectó la presencia del promotor 35S. Con los resultados obtenidos, se contribuye a asegurar la integridad genética de los materiales que se conservan en el Centro Nacional de Recursos Genéticos.
A pesar que, existen varios reportes de técnicas para la identificación de algodón transgénico [15, 16, 17] hasta nuestro conocimiento, no hay reportes de la monitorización de eventos transgénicos en otros bancos de germoplasma.

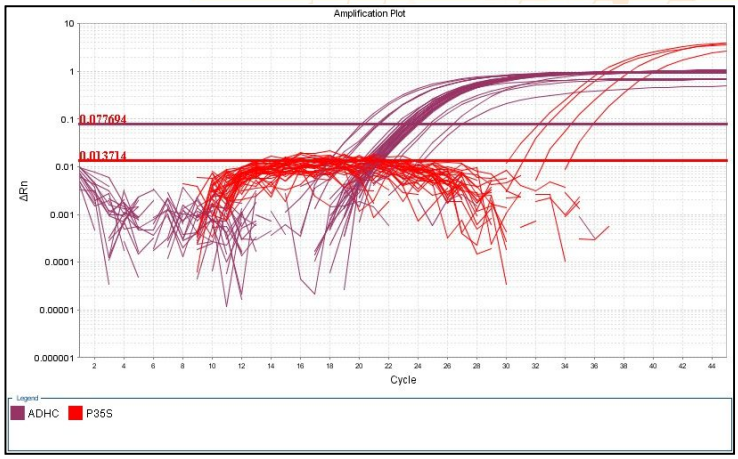


Figura 1. Grafica de amplificación del p35S y *adh*C en DNA de algodón. Las líneas curvas de color rojo representan la fluorescencia del promotor 35S mientras que, las de color púrpura al gen interno *adh*C. Las líneas rectas paralelas al eje de las abscisas corresponden a los umbrales de cada blanco. La fluorescencia observada por debajo del umbral corresponde al ruido residual.

CONCLUSIONES

La metodología de PCR tiempo real fue establecida para realizar la monitorización de OGMs en DNA de algodón obtenido de tejido foliar.

No se detectó la presencia adventicia de eventos transgénicos en 26 materiales de algodón monitorizados en resguardo a largo plazo en el CNRG, lo que contribuye a asegurar la integridad genética de las accesiones conservadas.

REFERENCIAS

[1] M. M. Sachs, "Cereal Germplasm Resources," Plant Physiol., vol. 149, no. 1, pp. 148-151, 2009.

[2] P. Galeano, C. M. Debat, F. Ruibal, L. F. Fraguas, and G. A. Galván, "Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay," Environ. Biosafety Res., vol. 9, no. 3, pp. 147–154, 2010.

[3] B. De Santis et al., "Case studies on genetically modified organisms (GMOs): Potential risk scenarios and associated health indicators," Food Chem. Toxicol., 2017.

[4] Q. Xu et al., "Analysis of complete nucleotide sequences of 12 *Gossypium* chloroplast genomes: origin and evolution of allotetraploids," PLoS One, vol. 7, no. 8, p. e37128, 2012.

[5] E. Montes et al., "Assessment of Gene Flow between *Gossypium hirsutum* and *G. herbaceum*: Evidence of Unreduced Gametes in the Diploid Progenitor.," G3 (Bethesda), vol. 7, no. 7, pp. 2185–2193, 2017.

[6] SENASICA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 8 de septiembre 2017. Disponible en: www.gob.mx/senasica.

[7] CIBIOGEM. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. Consultado el 8 de septiembre 2017. Disponible en: www.conacyt.gob.mx/cibiogem.

[8] J. Luthy, "Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods," Food Control, vol. 10, no. 6, pp. 359–361, 1999.

[9] S. C. Neal, "Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications," Ed. John Wiley & Sons. Knoxville, Tennessee. pp. 224-226, 2008.

[10] GMO METHODS. European Union Reference Laboratory for GMO Food and Feed. Consultado el 14 de septiembre de 2017. Disponible en: http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/.

[11] I. Erkan and K. Dastan, "Real-time PCR detection of genetically modified organisms in several food products and their environmental effects in turkey," Fresenius Environmental Bulletin. Vol. 26 No. 4 pp. 2589-2595, 2017.

[12] M. Youssef, R. Valdez-Ojeda, J. Ku-Cauich and R. Medrano, "Enhanced Protocol for Isolation of Plant Genomic DNA", Journal of Agriculture and Environmental Sciences, vol. 4, no. 2, pp. 172–180, 2015.

[13] R. Levin, W. Wagner, P. Hoch, M. Nepokroeff, J. Pires, E. Zimmer and K. Sytsma, "Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbc*L and *ndh*F data", American Journal of Botany, vol. 90, no. 1, pp. 107-115, 2003.

[14] M. Pérez-Urquiza, J. Rivera-Mellado and E.A. Matus-Cundapi, "Manual de Protocolos de Medición de Organismos Genéticamente Modificados". Elaborado en el Centro Nacional de Metrología, pp. 39-45, 2013.

[15] G. J. Randhawa and R. Chhabra, "Genetically Modified Cotton in India and Detection Strategies," Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 958, pp. 17–28, 2013.

[16] S. Shree Vidhya, P. H. Ramanjini Gowda, K. N. Yogendra, T. M. Ningaraju and T. Salome, "Detection of genetically modified cotton seeds using PCR and real-time PCR," Indian Journal of Biotechnology, vol. 11, pp. 176-181, 2012.

[17] V. S. Khadye and A. V. Sahasrabudhe, "Rapid detection of genetically modified organisms in cotton seeds by real time PCR," International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research, vol. 1, no. 4, pp. 1-8, 2012.

USO DE MARCADORES MOLECULARES SSR PARA LA DETECCIÓN DE PLANTAS CIGÓTICAS DE LIMÓN MEXICANO.

*Bermúdez-Guzmán, M.J., Orozco-Gutiérrez, G., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J.J., y García-Mariscal, K.P.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Tecomán, Km. 35 carretera Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, México. CP. 28100.

*Autor para correspondencia: bermudez.manuel@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La apomixis es un tipo de reproducción asexual que genera semillas que contienen embriones genéticamente idénticos al progenitor. La identificación de plantas híbridas se ha realizado mediante el uso de caracteres morfológicos, ensayos isoenzimáticos, citometría de flujo y marcadores moleculares. En limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) únicamente se han utilizado marcadores DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) para la identificación de plantas híbridas, por lo que no existen reportes que hagan uso de marcadores de Secuencias Simples Repetidas (SSR) para este propósito. El objetivo del presente trabajo fue identificar híbridos derivados de la polinización controlada entre *C. aurantifolia* var. "Colimex" X *C. limon* var. "Rosenberg" utilizando marcadores moleculares SSR. Se evaluaron en total ocho marcadores moleculares SSR sobre los progenitores utilizados en este estudio y fueron seleccionados los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 para la identificación de híbridos en la población progenie. De un total de 40 individuos F1 procedentes de la cruza "Colimex" X "Rosenberg", se logró detectar 17 plantas híbridas. Los resultados indican que los marcadores SSR son eficientes y confiables para la identificación de híbridos de limón mexicano.

Palabras clave: Cítricos; *Citrus aurantifolia*; híbridos; apomixis.

INTRODUCCIÓN

La mayor producción de fruta de cítricos se genera en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), es un arbusto perenne con no más de 5 metros de altura, produce flores todo el año, pertenece a la familia de las Rutaceae [1] y proviene de la cruza de *C. medica* x *C. limón* X *C. micrantha* [2]. En el Pacífico mexicano se cultivaron durante el año 2016, aproximadamente 107,500 ha con limón. Los principales estados productores fueron: Michoacán con 48,612 ha, Colima 18,979 ha, Oaxaca 20,870 ha y Guerrero 6,620 ha. La producción anual de fruta de limón mexicano superó el millón de toneladas con un valor superior a los tres mil millones de pesos. Esta agroindustria genera una gran cantidad de empleos en las actividades del campo, en las empacadoras, la industria, el transporte, la comercialización y en subproductos [3]. La industria citrícola requiere constantemente de nuevas variedades, para satisfacer las necesidades de fruta de calidad aceptable para el mercado nacional e internacional. Además, estas variedades deben tener también características agronómicas, que ayuden a reducir las amenazas que representan algunas enfermedades de alto impacto económico como lo es actualmente el Huanglonbing (HLB).

Las cruzas de cítricos obtenidos mediante polinización controlada permiten la obtención de plantas cigóticas, las cuales son más vigorosas y compiten mejor con plantas nucelares [4]. Dentro de este mejoramiento genético de manera convencional, se han utilizado marcadores morfológicos para la identificación de híbridos de limón mexicano, para selección de árboles con características deseables; estos marcadores han estado basados en la morfología de la hoja principalmente, sin embargo, no permiten identificar con exactitud entre plantas nucelares y cigóticas [5]. Existen varios reportes en donde se hace uso de marcadores moleculares para la identificación de híbridos en cítricos provenientes de progenitores que poseen características agronómicas deseables, y resistencia a enfermedades; siendo ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y las secuencias simples repetidas (SSR) los más utilizados [6, 4, 7]. Oliveira *et al*. (2002) y Yildiz *et al*. (2013) [5, 4] emplearon marcadores SSR para la identificación de individuos nucelares en una población de híbridos producida por cruzamientos en cítricos de mandarinas y naranjas. También el marcador molecular RAPD reveló que esta técnica es capaz de separar plantas nucelares y cigóticas en *C. aurantifolia* y *C. reticulata* [7]. Por otra parte, Ruiz *et al*. (1999) [6] compararon el uso de marcadores SSRs con isoenzimas, concluyendo que los SSRs son más eficientes para identificar el origen sexual en plántulas de cítricos ya que produjo un alto nivel de polimorfismo. En el programa de mejoramiento genético del INIFAP, se realizan rutinariamente cruzas entre limones mexicanos (*C. aurantifolia*) y limones italianos (*C. limon*), ya que se ha observado que la progenie presenta cierta tolerancia a la enfermedad del HLB, principal problema fitosanitario que afecta la productividad en la región. A pesar de que existen abundantes reportes para la identificación de plantas de origen cigótico en una gran diversidad de cítricos (naranjas, limones, mandarinas, toronjas) utilizando diversos marcadores moleculares, en México hasta la fecha no se han reportado estudios utilizando marcadores SSR para identificar plantas híbridas de limón mexicano. Por lo anterior, resulta necesario identificar híbridos derivados de la polinización controlada entre *C. aurantifolia* variedad "Colimex" X *C. limón* variedad "Rosemberg" utilizando marcadores moleculares SSR. Los resultados obtenidos permitirán la identificación de plantas de origen sexual en etapas tempranas, ahorrándose tiempo y reduciendo en gran medida el costo de propagación de individuos que carecen de características híbridas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron hojas con apariencia sana de árboles de limón de dos poblaciones progenie para identificar individuos de origen cigótico y confirmar la condición híbrida de las plantas. La cruza *C. aurantifolia* (♀) X *C. limon* (♂) consistió de 40 individuos, mientras que la cruza *C. limon* (♀) X *C. aurantifolia* (♂) la constituyeron 43 individuos. El muestreo se realizó en árboles de 12 meses de edad, los cuales se encuentran establecidos en el campo dentro del programa de mejoramiento genético de limón mexicano del INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima, México, ubicado a 60 msnm.

Extracción de DNA genómico

Se utilizó el método descrito por Bermúdez-Guzmán *et al*. (2016) [8] con algunas modificaciones. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 4 °C y 13,500 rpm. Las hojas de las plantas muestreadas se lavaron con agua y jabón corrientes. Enseguida se pesaron aproximadamente 100-200 mg de tejido foliar y se pulverizaron en un mortero conteniendo nitrógeno líquido y homogeneizados con 1 mL de solución amortiguadora CTAB [100 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM de EDTA pH 8, 1.4 M de NaCl, 3% (p/v) de CTAB y 1% (p/v) de PVP]. Posteriormente se adicionaron 10 µL de 2-β-mercaptoetanol concentrado y

5 µL de proteínasa K (20 mg/mL). Las muestras se incubaron durante 45 min a 65 °C en baño maría, se mezclaron por inversión cada 5-10 minutos, después se centrifugaron durante tres minutos. La fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo y se agregó 5 µL de RNasa A 10 mg/mL (Sigma Aldrich) a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó un volumen de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente usando un vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos. El sobrenadante recuperado se colocó en tubos de 1.5 mL y el DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a -20 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el DNA se lavó con 500 µL de etanol al 70%; los tubos se centrifugaron durante 2 minutos, la fase acuosa se decantó y se invirtieron los tubos sobre papel absorbente para retirar el exceso de etanol. Los DNA se secaron a temperatura ambiente, resuspendidos en 80 µL de amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH,8) y finalmente, almacenados a -20 °C.

Cuantificación, pureza e integridad del DNA genómico

La concentración del DNA (ng/µL) se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo Scientific). La pureza se midió considerando las relaciones de $A_{260:280}$ y $A_{260:230}$. La integridad de los ácidos nucleicos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma Aldrich) al 1% cargando 5 µL de DNA genómico de cada muestra. El gel se tiñó con Bromuro de etidio 10 mg/Ml (Sigma Aldrich) y visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador (UVP).

Análisis de marcadores SSR

Los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* se analizaron con ocho juegos de oligonucleótidos descritos por Kijas *et al*., (1997) [9] para identificar aquellos que generan polimorfismos diferenciales en ambas especies. Los oligonucleótidos seleccionados se utilizaron para analizar la población de 40 individuos progenie de *C. aurantifolia* X *C. limon*. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 15 µL conteniendo 7.5 µL de REDTaq ReadyMix™ (Sigma Aldrich), 5 µL de DNA genómico (20 ng/µL), 1 µL de cada oligonucleótido y 0.5 µL agua grado molecular. Las condiciones de amplificación para la PCR se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene Labnet y fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. La extensión final fue de 72 °C por 10 min.

Se utilizó la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes utilizando el sistema de dobles geles "PerfectBlue" (PeQlab). Se cargó 1 µL de marcador de peso molecular de 25 y 50 pares de bases (pb) (Bioline) y 3 µL del producto de PCR de cada muestra. Los geles se prepararon en un volumen de 30 mL conteniendo acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 6%, amortiguador TBE 1 X, 140 µL de APS al 25%, 35 µL de TEMED y agua destilada estéril, después se corrieron a 200 V durante 50 minutos. Finalmente se tiñeron con solución de plata de acuerdo Sanguinetti *et al*., (1994) [10] con algunas modificaciones: 10 minutos en solución fijadora (10% de etanol y 0.5% de ácido acético), 1 enjuague con agua destilada, 10 minutos en solución de tinción (0.2% de $AgNO_3$), 1 enjuague con agua destilada, 10-15 minutos en solución reveladora (3% de NaOH y 0.5% de formaldehído) y un último enjuague con agua destilada. Los geles se visualizaron en un transiluminador con luz blanca para su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron ocho oligonucleótidos para detectar bandas diferenciales en los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* utilizados en el presente estudio (Tabla 1). Los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 se seleccionaron debido a que permitieron la amplificación de bandas polimórficas de fácil interpretación; cuatro de los oligonucleótidos amplificaron mayormente bandas monomórficas no informativas y de baja resolución, por lo que no se utilizaron para la detección de híbridos en las poblaciones analizadas. El iniciador TAA41 generó bandas muy difusas que no se registraron. Por otra parte, el cebador TAA52 no permitió la amplificación de algún segmento de DNA en las muestras analizadas (Figura 1).

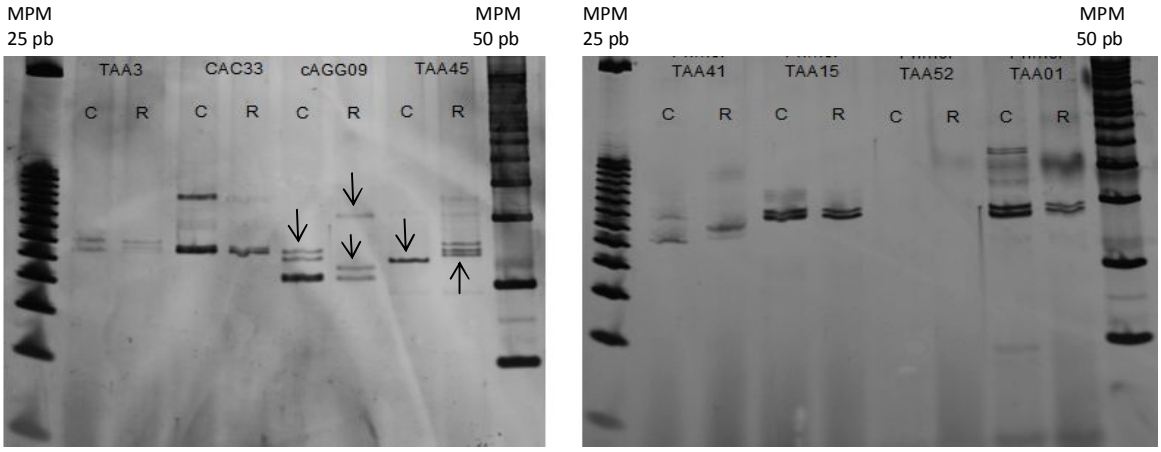


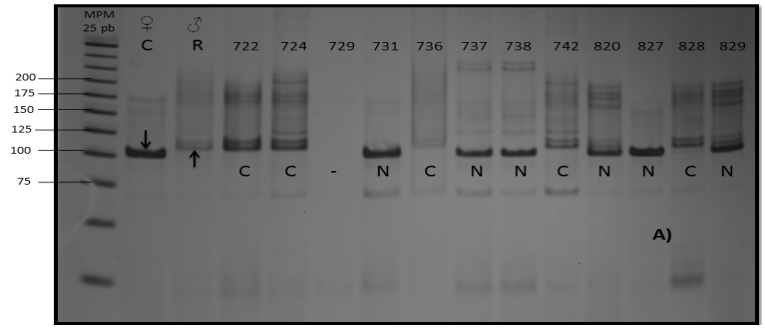
Figura 1. Evaluación de oligonucleótidos de marcadores SSR a partir de DNA de progenitores. C: *Citrus aurantifolia* var. "Colimex". R: *Citrus limon* var. "Rosenberg". MPM: Marcador de Peso Molecular 25 y 50 pb (Bioline).

Los oligonucleótidos de la serie TAA descritos por Kijas *et al*. (1997) [9] se han utilizado ampliamente en la detección de híbridos entre cruzamientos de varias especies de cítricos como toronja (*C. paradisi*), naranjo trifoliado (*C. trifoliata*), naranjo dulce (*C. sinensis*) y mandarina (*C. reticulata*) [6, 11, 4, 12]. Sin embargo, no hay reportes de su uso en limón mexicano (*C. aurantifolia*) y limón italiano (*C. limon*), por lo que estos resultados constituyen el primer reporte en estas especies para determinar su potencial como detectores de híbridos en los programas de mejoramiento genético.

En la población de 40 individuos procedentes de la cruza de *C. aurantifolia* var. "Colimex" X *C. limon* var. "Rosenberg" se lograron detectar un total de 17 híbridos con los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 (Tabla 2). El marcador TAA45 amplificó dos alelos polimórficos, uno presente en "Colimex" y ausente en "Rosenberg" de aproximadamente 100 pb y otro presente en "Rosenberg" y ausente en "Colimex" de 110 pb. En la figura 2 A se observan algunos de los híbridos detectados con el marcador TAA45 (722, 724, 736, 742 y 828), el cual también amplificó otras bandas polimórficas que no se tomaron en cuenta para la identificación de híbridos debido a su baja resolución. El iniciador cAGG09 amplificó cuatro bandas polimórficas en la población analizada, con pesos moleculares aproximados de 90, 100, 110 y 170 pb. Los híbridos de "Colimex" se identificaron por los alelos de 90 y 170 pb (Figura 2 B, carriles 722, 724, 736, 738 y 742), los cuales están presentes en "Rosenberg" (donador del polen) y ausentes en "Colimex" (receptor del polen).

Tabla 2. Origen cigótico o nucelar de la población de *C. aurantifolia* X *C. limon* mediante análisis SSR utilizando dos pares de oligonucleótidos. C: cigótico. N: nucelar. I: Indeterminado.

***C. aurantifolia* (♀) X *C. limon* (♂)**							
No.	**Muestra**	**cAGG9**	**TAA45**	**No.**	**Muestra**	**cAGG9**	**TAA45**
1	722	C	C	21	788	N	N
2	724	C	C	22	790	C	C
3	729	N	I*	23	794	C	C
4	731	N	N	24	796	N	N
5	736	C	C	25	798	N	I*
6	737	N	N	26	800	N	N
7	738	C	N	27	804	N	N
8	742	C	C	28	766	N	N
9	820	N	N	29	767	C	C
10	827	N	N	30	771	N	N
11	828	C	C	31	775	C	N
12	829	N	C	32	776	N	N
13	743	N	N	33	778	N	N
14	745	C	N	34	780	N	N
15	747	N	N	35	781	C	C
16	748	C	I*	36	784	C	C
17	750	C	N	37	831	N	N
18	752	C	C	38	833	N	N
19	754	N	N	39	838	N	N
20	761	N	N	40	839	C	C



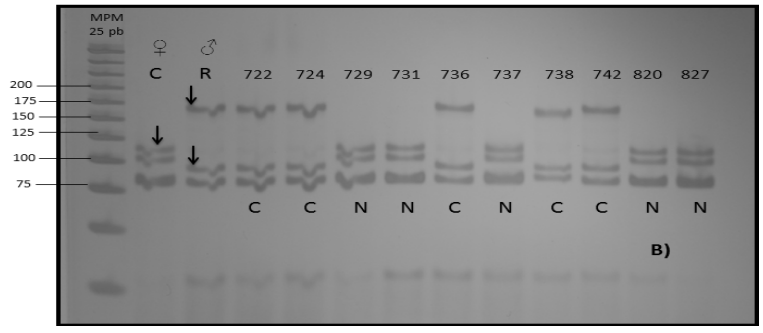


Figura 2. Perfiles electroforéticos obtenidos con los oligonucleótidos TAA45 (A) y cAGG09 (B). MPM: Marcador de Peso Molecular 25 pb (Bioline). ♀: Planta receptora de polen. ♂: Planta donadora de polen. C: *C. aurantifolia* var. "Colimex". R: *C. limon* var. "Rosenberg". N: origen nucelar. C: origen cigótico (híbridos). Los números corresponden a diferentes muestras progenie.

Se considera que un híbrido puede ser determinado identificando un solo locus codominante para el cual los progenitores no comparten alelos, es decir, cruzas de la configuración aa x bb, ab x cc o ab x cd. También se pueden usar marcadores dominantes, como RAPD e ISSR, si el progenitor receptor del polen es 00 (banda ausente) y el donador del polen es 11 (banda homocigótica presente) [13]. Sin embargo, la confirmación con un segundo locus es siempre deseable para confirmar la condición híbrida del individuo, lo cual se realizó en el presente trabajo con el uso de los marcadores TAA45 y cAGG09, cuyos polimorfismos de cada progenitor segregaron en la descendencia según la población correspondiente.

CONCLUSIONES

Los marcadores SSR cAGG9 y TAA45 permiten la identificación de híbridos de limón mexicano. El uso del oligonucleótido cAGG9 resultó ser la mejor opción para detectar plantas híbridas debido a que se amplificaron alelos con pesos moleculares bien definidos, mientras que el cebador TAA45 generó patrones de bandas de pesos moleculares similares dificultándose el análisis de los datos. Se recomienda realizar la amplificación por PCR con estos dos juegos de oligonucleótidos para generar polimorfismos diferenciales que detecten híbridos en poblaciones de las cruzas de *C. limon* X *C. aurantifolia*.

REFERENCIAS

[1] Phillips, R. L., Goldweber, S., Campbell C.W., Balerdi, C. F. y Crane, J. H. 2012. El limón criollo en Florida. Universidad de Florida. Institute of Food and Agricultura Sciences, Extension. Florida A&M University Cooperative Extension Program Gainesville FL 1-3.

[2] AL-Anbari, A. K., Kanawapee, N., AL-Kazragi, T. A., AL-Jewari, H., Al-Mashhadani, A., Barusrux, S., Pornpongrungrueng, P y Theerakulpisut, P. 2014. Genetic diversity of citrus (Rutaceae) in Iraq based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. African Journal of Agricultural Research 9: 1012-1019.

[3] SIAP. 2016. Cierre de la producción agrícola por cultivo.www.siap.gob.mx/cierre-de-la-producción-agricola-por-cultivo.

[4] Yildiz, E.; Klaplankiran, M.; Demirkeser, T. H.; Uzun, A. and Toplu, C. 2013. Identification of zygotic and nucelar individuals produced from several Citrus crosses using SSRs markers. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici 41(2): 478-484.

[5] Oliveira, A. C.; Novac, G. A.; Cristofani, M. and Machado, M. A. 2002. Identification of Citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR. Euphytica. 128: 337-339.

[6] Ruiz, C., Paz, B. M. y Asíns, M. J. 1999. A quick methodology to identify sexual seedling in citrus breeding programs using SSR markers. Euphytica 112: 89-94.

[7] Mondal, B. y Saha, R. 2014. Identification of Zygotic and Nucellar seedling of Citrus aurantifolia and Citrus reticulata using RAPD. International Journal of Advanced Biotechnology and Research 15: 25-30.

[8] Bermúdez-Guzmán, M. J., Guzmán-González, S., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J. J., Buenrostro-Nava, M. T. y Michel-López, C. Y. 2016. Optimización de un protocolo para

aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7:897-910.

[9] Kijas, J. M. H.; Fowler, J. C. S.; Thomas, M. R and Roose, M. L.1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. Theoretical and Applied Genetics. 94: 701-706.

[10] Sanguinetti, C. J.; Neto, E. D. and Simpson, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques. 17(5): 915–919.

[11] Ahmad, M.; Javaid, A.; Rahman, H.; Hussain, S. I.; Ramzan, A. and Ghafoor, A. 2012. Identification of mandarin X orange hybrids using Simple Sequence Repeat markers. Journal of Agricultural Research. 50(2):225-232.

[12] Mondal, B.; Pramanick, S.; Saha, R. and Karmakar, M. 2015. Application of Simple Sequence Repeat markers for demarcation of Citrus reticulata nucellar and hybrid seedlings. International Journal of Bioscience. 6(2): 128-133.

[13] Kepiro, J. L. and Roose, M. L. 2007. Nucellar embryony. In: I. Khan (eds). Citrus genetics, breeding and biotechnology. CABI. UK. pp. 141-149.

IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL SCYLV EN *Saccharum* spp. EN LA REGIÓN CAÑERA DEL PACÍFICO DE MÉXICO.

*Bermúdez-Guzmán, M.J., Orozco-Gutiérrez, G., Cervantes-Preciado, J.F., y García-Preciado, J.C.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Tecomán, Km. 35 carretera Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, México. CP. 28100.

*Autor para correspondencia: bermudez.manuel@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El síndrome de la hoja amarilla (YLS) de la caña de azúcar, causado por el SCYLV, es una importante enfermedad que afecta a la caña de azúcar a nivel mundial. En México la detección de YLS se ha basado en el síntoma característico de amarillamiento intenso en la nervadura central de la hoja, sin embargo, este síntoma puede ser ocasionado también por otros factores bióticos y abióticos. El objetivo del trabajo fue identificar la presencia del SCYLV en la región cañera del Pacífico de México utilizando la técnica de RT-PCR. Los resultados demostraron la presencia del SCYLV en los tres estados que abarcó el estudio. Algunas muestras con síntomas muy claros dieron negativo a SCYLV, probablemente porque la expresión de sus síntomas está asociada con algún otro factor. En Colima, se detectó al virus afectando la variedad CP 72-2086 en los municipios de Minatitlán, Quesería, Cuauhtémoc y Tecomán. En Jalisco, SCYLV se detectó en Autlán, El Grullo, Tamazula y Zapotiltic, afectando a las variedades Mex 79-431, Mex 69-290 y Colmex 95-27. Finalmente, en Nayarit la zona de estudio comprendió los municipios de Jala, Xalisco, Santa María del Oro y Tepic, donde el SCYLV se encontró afectando la variedad CP 89-2143.

Palabras clave: RNA; Virus; Caña de azúcar; diagnóstico de enfermedades.

INTRODUCCIÓN

Entre los patógenos virales de importancia económica a nivel mundial para el cultivo de la caña de azúcar se encuentran el *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), agente causal del síndrome de la hoja amarilla (YLS); este término "síndrome de la hoja amarilla" fue usado inicialmente para referirse a una enfermedad causada por un fitoplasma, cuyos síntomas son similares a los de SCYLV, en ciertas partes del mundo [1]. Actualmente, este término se emplea para referirse a la forma viral de la enfermedad [2,3]. El SCYLV es integrante de la familia *Luteoviridae*, en la cual se ubican aquellos virus que ocasionan síntomas de amarillamiento en muchas plantas hospederas infectadas, incluida la caña de azúcar. Todos los luteovirus son partículas muy pequeñas en forma de icosaedro de aproximadamente 25 nm de diámetro, compuestas de un elemento proteico y una molécula de ARN de cadena sencilla sentido positivo de aproximadamente 5,600 nucleótidos de longitud [4]. En el caso particular de SCYLV su genoma tiene aproximadamente 5,800 nucleótidos [5].

Histórica y potencialmente, los virus ocasionan las enfermedades más importantes en caña de azúcar a nivel mundial, causando grandes epidemias y pérdidas de enormes proporciones. En variedades afectadas por SCYLV se registran pérdidas en rendimiento de 40-50% [6], mientras que en plantas

asintomáticas con este mismo virus las mermas son de 10-30% [7,8]. Por lo anterior, este virus es considerado en los programas de mejoramiento genético de varios países cañeros, principalmente Brasil, en los que la selección y eliminación de clones susceptibles seguido de pruebas de patogenicidad se han vuelto procedimientos rutinarios [9].

El SCYLV fue detectado por primera vez en Hawaii en el año de 1988 y en Brasil en 1990 [6, 10]. Este virus se ha reportado en las áreas productoras de caña de azúcar de todo el mundo. Por esta razón es la enfermedad viral más estudiada en este cultivo desde su aparición. El virus fue responsable de drásticas pérdidas económicas en el sureste de Brasil a comienzos de 1990 y actualmente, es el principal problema fitosanitario en los programas de mejoramiento genético de ese país [9]. En México, los síntomas del YLS fueron observados por primera vez en el año de 1996 afectando a la variedad CP 72-2086 en la comunidad de La Margarita, Oaxaca. Ese mismo año se reportó su presencia en la misma variedad en Chiapas, Colima y Veracruz. También se detectó en Sinaloa afectando a la variedad Mex 57-473 [11]. Sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad realizado estuvo basado en síntomas foliares y °Brix del raquis de la hoja. Lo anterior no es concluyente debido a que el amarillamiento es un síntoma muy general de varias enfermedades y deficiencias de micro y macro nutrientes, además de que el patrón de coloración depende de variables como el genotipo y condiciones ambientales. Por otra parte, los niveles del porcentaje de los °Brix también se ven afectados por otras enfermedades al igual que por elementos químicos como el potasio (K), por lo que se pueden cometer errores en emitir diagnósticos basados en estos parámetros. Los métodos de detección de SCYLV más utilizados y fiables están basados en la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) y son los más utilizados en la actualidad por los programas de mejoramiento genético de la caña de azúcar en varias partes del mundo [12,13]. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia del SCYLV en la región cañera del Pacífico Mexicano utilizando la técnica de RT-PCR. Los resultados de este estudio permitirán detectar al SCYLV en genotipos de caña de azúcar dentro del programa de mejoramiento genético de este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Durante el año 2014 se colectaron muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit. Las plantas presentaron sintomatología típica del SCYLV o fueron asintomáticas. Las muestras se envolvieron en bolsas plásticas, colocadas en hieleras con refrigerantes térmicos y se trasladaron al laboratorio de biotecnología de plantas del Campo Experimental Tecomán del INIFAP ubicado en el km 35 de la carretera Colima-Manzanillo en Colima.

Extracción, cuantificación y determinación de la pureza e integridad del RNA total

Aproximadamente 200 mg de tejido foliar fueron pulverizados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue depositado en tubos de 1.5 mL y homogeneizado con 500 µL de Tripure (Roche). Se siguieron las recomendaciones del fabricante para la extracción del RNA total. Finalmente, el RNA obtenido fue resuspendido en agua libre de RNasa (0.01% DEPC) y almacenado a -70°C. La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) utilizando 1 µL del RNA total extraído y se midieron las relaciones de $A_{260/280}$ y $A_{230/280}$ para determinar su pureza. La integridad del RNA fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y visualizado en bromuro de etidio en un transiluminador con luz ultravioleta (UVP).

Clonación de un fragmento del SCYLV en pGEM-T Easy

Con el objetivo de contar con un control positivo para la detección del virus, el producto de PCR de 512 pb correspondiente a una muestra de Colima fue purificada a partir del gel de agarosa con el kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el fragmento se clonó con el sistema de "pGEM-T Easy" (Promega) y se transformó en células de *E. coli* JM109 (Promega), las cuales se hicieron competentes previamente con $CaCl_2$ de acuerdo a Riley *et al*. (2008) [14]. La comprobación del inserto clonado en el vector se realizó mediante la extracción de DNA plasmídico [15] a las colonias recombinantes y posterior reacción de digestión con las enzimas *Eco*R I y *Not* I.

Secuenciación y edición de la secuencia CP del SCYLV

El DNA plasmídico del fragmento clonado en *E. coli* fue secuenciado en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en ambas direcciones por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems. La edición y el ensamblado de las secuencias "forward" y "reverse" se realizó con el programa CLC Main Workbench 7. Finalmente se comparó la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para SCYLV en la base de datos del "National Center for Biotechnology information" (NCBI) empleando la herramienta "Basic Local Alignment Searh Tool" (BLAST).

Detección del SCYLV por RT-PCR

La reacción de transcripción inversa (RT) del RNA total se realizó utilizando el kit "Reverse Transcription System" (Promega). El RNA fue desnaturalizado a 70°C durante 10 min; la mezcla de reacción RT se llevó a cabo en un volumen de 20 µL conteniendo 5 mM de $MgCl_2$, amortiguador RT 1 X, 1 mM de cada dNTP, 1 u/µL de inhibidor de ribonucleasa RNasin® recombinante, 15 u/µg de transcriptasa inversa AMV, 0.5 µg de mezcla de oligonucleótidos por µg de RNA y 5 µL de RNA total (1.5 µg aproximadamente). La mezcla anterior fue incubada a temperatura ambiente 10 min y luego a 42°C durante 45 min. Inmediatamente después se incubó a 95°C durante 5 min y finalmente 0-5°C por 5 min. Los cDNA resultantes fueron utilizados como molde para la amplificación por PCR con los oligonucleótidos descritos por Xie *et al*. (2009) [12]. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1 µM de cada oligonucleótido, 3 µL de cDNA y H_2O grado molecular. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Labnet) con el siguiente programa: un ciclo de 50°C por 30 min y 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 1 min seguido de una extensión final a 72°C por 5 min. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1 X y fueron cargados 12.5 µL de los productos de PCR; las muestras se corrieron con un voltaje de 120 V. Finalmente los geles se tiñeron con BrEt y se visualizaron en un transiluminador con luz UV (UVP) para el análisis de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El síntoma característico de amarillamiento intenso de la nervadura central de hojas de caña de azúcar, relacionado con la presencia del SCYLV, se encontró en la mayor parte de material muestreado procedente de diferentes variedades en los tres estados del Pacífico de México (Figura 1).



Figura 1. Cultivo de caña de azúcar abandonado con problemas de virosis severa por el SCYLV.

El control positivo utilizado para detectar la presencia y distribución del SCYLV en el Pacífico de México se obtuvo de una muestra con síntomas característicos de YLS procedente del estado de Colima. Se amplificó y clonó un fragmento de 512 pb; posteriormente, fueron obtenidas colonias recombinantes y se realizó el análisis restrictivo con *Eco*R I y *Not* I para comprobar la presencia del fragmento clonado (Figura 2 A), el cual finalmente fue secuenciado. El análisis BLAST de la secuencia presentó de 99-100% de identidad con otras accesiones de SCYLV y fue depositada en la base de datos de NCBI con el registro KT334298. Se determinó que la secuencia corresponde a una región parcial del gen de la proteína de la cápside (CP) del SCMV. Todos los productos de RT-PCR sometidos a electroforesis en gel de agarosa que mostraron la amplificación de fragmentos de ~512 pb del SCYLV fueron considerados como positivos al virus (Figura 2 B). En total se analizaron 233 muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente, sintomáticas y asintomáticas para YLS, de las cuales 34 de ellas dieron positivo a SCYLV.

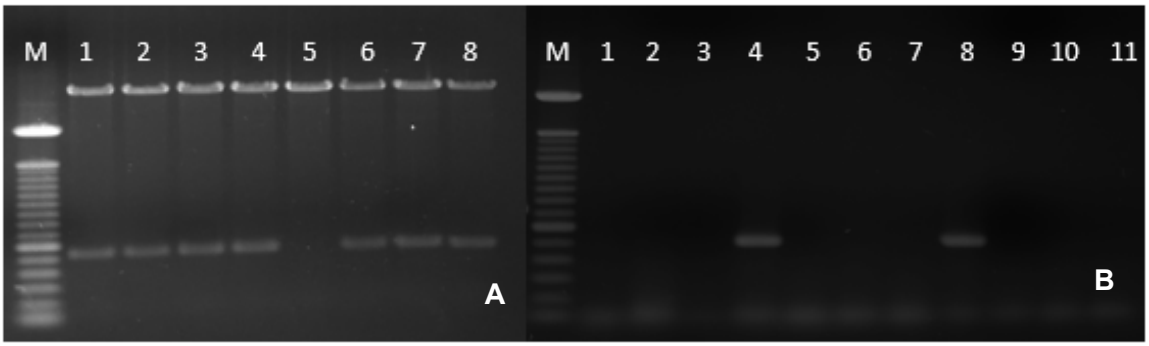


Figura 2. A) Digestión enzimática con *Eco*R I y *Not* I para liberación del inserto de 512 pb del fragmento parcial CP de SCYLV clonado en el vector pGEM T Easy. B) Detección del *Sugarcane yellow leaf virus*

(SCYLV) mediante RT-PCR en muestras de caña de azúcar procedentes del Pacífico de México. Los números corresponden a diferente número de muestras.

El virus se distribuyó en todas las zonas cañeras del Pacífico de México que abarcó el presente estudio (Tabla 1). En Colima, se detectó la presencia del SCYLV afectando la variedad CP 72-2086 en los municipios de Minatitlán, Quesería, Cuauhtémoc y Tecomán. En Jalisco, el virus se detectó en Autlán, El Grullo, Tamazula y Zapotiltic, afectando a las variedades Mex 79-431, Mex 69-290 y Colmex 95-27. Finalmente, en Nayarit la zona de estudio comprendió los municipios de Jala, Xalisco, Santa María del Oro y Tepic, el SCYLV se encontró afectando la variedad CP 89-2143. Algunas muestras con síntomas muy claros dieron negativo a la RT-PCR para identificar SCYLV, probablemente porque la expresión de sus síntomas está asociada con algún otro factor. De manera similar en la India en un estudio se analizaron 30 muestras de caña de azúcar de diversas variedades y que presentaron características de YLS; se detectó la presencia del SCYLV en 27 de ellas que amplificaron un fragmento de 610 pb mediante RT-PCR [16]. En otro estudio se determinó la distribución del SCYLV en diferentes provincias de Cuba. Se analizaron 35 campos (348 ha), de los cuales se tomaron 525 muestras de hojas en 13 cultivares comerciales. La detección del virus se realizó por Inmunoimpresión de Tejidos y por Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR). En la mayoría de las provincias fue alta la incidencia de síntomas asociados a esta enfermedad (82,29%). Se detectó, por primera vez, la presencia de este patógeno en áreas comerciales de todas las provincias que cultivan la caña de azúcar en Cuba. En la mayoría de los cultivares infectados, se observó el mayor grado de severidad de los síntomas, asociada a esta enfermedad [17]. En nuestro país los productores cañeros han estado sembrando las mismas variedades comerciales por más de 30 años, estas plantas han presentado síntomas del síndrome de la hoja amarilla con el paso del tiempo; sin embargo, se siguen utilizando en la actualidad.

Tabla 1. Relación de algunas muestras de caña de azúcar positivas al SCYLV mediante RT-PCR en la región cañera del Pacífico de México.

No.	Muestra	Municipio	Estado	Georeferencia	Variedad
1	2	Tecomán	Colima	N 18°56'06.52'' W 104°00'03.54''	*Saccharum* spp.
2	37	Tecomán	Colima	N 18°48'33.23'' W 103°50'37.89''	Mex 69-290
3	123	Zapoltictic	Jalisco	N 19°38'42.58'' W 103°24'31''	Atemex 96-40
4	138	Zapoltictic	Jalisco	N 19°38'42.58'' W 103°24'31''	Atemex 96-40
5	148	Tecomán	Colima	N 18°52'36.24'' W 103°52'1.49''	CP 72-2086
6	336	Tecomán	Colima	N 18°52'36.24'' W 103°52'1.49''	CP 72-2087
7	340	La Huerta	Jalisco	N 19°31'07.39'' W 104°32'11.61''	Atemex 96-40
8	342	Cuautitlán	Jalisco	N 19°26'49.58'' W 104°24'10.45''	*Saccharum* spp.
9	344	Cuautitlán	Jalisco	N 19°26'54.74'' W 104°23'40.70''	Mex 79-431
10	349	El Grullo	Jalisco	N 19°47'44.20'' W 104°13'38.63''	Atemex 96-40
11	27	Tecomán	Colima	N 18°52'36.24'' W 103°52'1.49''	CP 72-2086
12	58	Tecomán	Colima	N 18°52'36.24'' W 103°52'1.49''	CP 72-2086
13	60	Tecomán	Colima	N 18°52'36.24'' W 103°52'1.49''	CP 72-2086
14	217	Jala	Nayarit	N 21°05'08.59 W 104°25'56.82''	Mex 69-290
15	248	Zapotiltic	Jalisco	N 19°38'42.58'' W 103°24'31''	Atemex 96-40
16	299	Santa María del Oro	Nayarit	N 21°20'23.8'' W 104° 34'55.1''	Mex 69-290
17	318	Tecomán	Colima	N 18°58'27.53'' W 103°51'17.04''	CP 72-2086
18	325	Tecomán	Colima	N 18°58'27.53'' W 103°51'17.04''	CP 72-2086

19	380	Tecomán	Colima	N 18°58'27.53'' W 103°51'17.04''	CP 72-2086
20	409	Tecomán	Colima	N 18°58'27.53'' W 103°51'17.04''	CP 72-2086

CONCLUSIONES

En los estados de Colima, Jalisco y Nayarit se detectó la presencia del SCYLV, agente causal del síndrome de la hoja amarilla. Este virus se encuentra ampliamente distribuido en las zonas cañeras del Occidente de México, probablemente por la presencia de áfidos vectores y la propagación por semilla estaca que puede estar infectada. El método de diagnóstico que se optimizó para la detección del SCYLV en el estudio realizado pueden ser empleados en diversas instituciones como la estación cuarentenaria del CIDCA, ya que continuamente realiza intercambio de germoplasma de caña de azúcar con otros países. Así mismo también es importante la detección de genotipos resistentes a este virus para estar preparados en el momento que ocurra una epidemia como las reportadas en otros países.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Moonan F. and Mirkov, T. E. 2002. Analyses of the genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*. Evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. J. Virol. 76: 1339-1348.

[2] Ahmad, Y. A., Girard, J. C., Fernandez, E., Pauquet, J., Lockhart, B. E. L., Letourmy, P. and Rott, P. 2007. Variation in virus populations and growth characteristics of two sugarcane cultivars infected by *Sugarcane yellow leaf virus* in different geographical locations. Plant Pathology 56: 743-754.

[3] Yan, S. L., Lehrer, A. T., Hajirezaei, M. R., Springer, A. and Komor, E. 2009. Modulation of carbohydrate metabolism and chloroplast structure in sugarcane leaves which were infected by *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). Physiol. Mol. Plant P. 73: 78-87.

[4] Domier, L. L. and D'Arcy, C. J. 2008. Luteoviruses. In: Brian W. J. Mahy and Marc H. V. Van Regenmortel (Eds). Desk encyclopedia of plant and fungal virology. pp. 197-204. Elsevier Academic Press Editorial. Oxford, UK.

[5] Chinnaraja, C., Viswanathan, R., Karuppaiah, R., Bagyalakshmi, K., Malathi, P., and Parameswari, B. 2013. Complete genome characterization of *Sugarcane yellow leaf virus* from India: Evidence for RNA recombination. Eur. J. Plant Pathol. 135:335-349.

[6] Vega, J., Scagliusi, S. M. M., and Ulian, E. C. 1997. Sugarcane Yellow Leaf Disease in Brazil: Evidence of Association with a Luteovirus. Plant Disease 81:21-26.

[7] Lehrer, A. T., and Komor, E. 2008. Symptom expression of yellow leaf disease in sugarcane cultivars with different degrees of infection by *Sugarcane yellow leaf virus*. Plant Pathology 57:178-189.

[8] Lehrer, A., Yan, S. L., Fontaniella, B., El-Sayed, A. and Komor, E. 2010. Carbohydrate composition of sugarcane cultivars that are resistant or susceptible to *Sugarcane yellow leaf virus*. J. Gen. Plant Pathol. 76:62-68.

[9] Gonçalves, M. C., Pinto, L. R., Souza, S. C. and Landell, M. G. A. 2012. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. Funct. Plant Sci. Biotechnol. 6:108-116.

[10] Schenck, S., Lehrer, A. T. and Wu, K. K. 2001. Yellow leaf syndrome. Hawaii Agriculture Research Center, Pathology Report 68.

[11] CONADESUCA (Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar) 2015. Fitopatologías. Disponible en: http://www.conadesuca.gob.mx Consultado el 29 de julio de 2015.

[12] Xie, Y., Wang, M., Xu, D., Li, R., and Zhou, G. 2009. Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. J. of Virol. Methods. 162:64-68.

[13] Zhu YJ, Lim STS, Schenck S, Arcinas A, Komor E. 2010. RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. European Journal of Plant Pathology 127: 263-273.

[14] Riley SP, Woodman ME, Stevenson B. 2008. Culture of *Escherichia coli* and Related Bacteria. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. 00:4.2:4.2.1-4.2.25.

[15] Engebrecht J, Brent R, Kaderbhai MA. 2001. Minipreps of Plasmid DNA. Current Protocols in Molecular Biology. 15: II:1.6:1.6.1-1.6.10.

[16] Singh D, Rao GP, Snehi SK, Raj SK, Karuppaiah R, Viswanathan R. 2011. Molecular detection and identification of thirteen isolates of *Sugarcane yellow leaf virus* associated with sugarcane yellow leaf disease in nine sugarcane growing states of India. Australasian Plant Pathol. 40: 522-528.

[17] Aday DOC, Hechavarría MLO, Zardón NMA, Rodríguez LE, Mesa LJM, Puchades IY, Delgado PJ, Díaz MFR. 2014. Distribución del *Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar* en Cuba. Rev. Protección Veg. 29: 177-184.

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE PESCADO Y ACEITE DE PESCADO ENCAPSULADO EN EL PERFIL QUÍMICO Y SENSORIAL DE LA CARNE DE POLLOS DE ENGORDE (ROSS).

*Baños-Lara, G., Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., González-Olivares, L. G. y Jaimez-Ordaz, J.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Carr. Pachuca-Tulancingo, km. 4.5. Mineral de la Reforma, Hgo., C.P. 42184

*Autor para correspondencia: geo21bala@gmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

En los últimos años, el empleo de ácidos grasos para la elaboración de productos diversos es muy común, está demostrado que suministrar omega-3 en la dieta de las aves mejora el perfil químico de la carne y en dosis específicas se puede evitar el sabor y olor típico a pescado [1]. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con encapsulados de aceite de pescado en el perfil químico y sensorial de la carne de pollo de engorde Ross. Se trabajó con un grupo de 45 pollos de engorde Ross divididos en tres grupos codificados como AP, APE y C. La diferencia en cada grupo fue la dieta de las aves; para el grupo AP se suplementó con aceite de pescado directamente en el pico; para el APE se suplementó con encapsulados de aceite de pescado (cápsulas de 1 g); mientras que las del grupo C fueron las aves control. Se realizó un análisis proximal de la carne de pollo (pechuga) siguiendo los métodos oficiales de la AOAC [2]. El análisis sensorial consistió en una prueba dúo-trío, con la finalidad de identificar posibles diferencias de las características sensoriales entre grupos; asimismo, se realizó una prueba hedónica, para saber el nivel de agrado del consumidor. Las dos pruebas sensoriales se realizaron con 10 panelistas semientrenados. Los resultaron promedios del análisis químico proximal fueron: • Grupo AP: 7.81±0.09% de grasa cruda y 23.64±0.50% de proteína. • Grupo APE: 7.25±0.35% de grasa cruda y 27.45±1.17% de proteína. • Grupo control: 4.79±0.21% de grasa cruda y 21.63±0.61% de proteína. El análisis estadístico realizado (ANOVA) indicó que hay diferencias significativas entre los grupos estudiados (P=0.05). A pesar de que en los grupos suplementados hay un incremento cercano al 3% de grasa cruda, es importante mencionar que es debido a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, entre los que destacan los omega-3, los cuales son benéficos para la salud. Por otro lado, en los grupos con dietas suplementadas, aumentó el contenido de proteína, lo cual es un indicativo de la mejora en la calidad nutricional de la carne de pollo obtenida.

Palabras clave: Suplementación; ácidos grasos omega 3; pollos de engorde; composición química; carne de pollo.

REFERENCIAS

[1 M. Betti, 1 B. L. Schneider, W. V. Wismer, V. L. Carney, M. J. Zuidhof, and R. A. Renema, "Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance", Poul. Sci., vol. 88, pp. 1085–1095, 2009.

[2] AOAC, Association of Official Methods of Analytical Chemist Inc., Washington, USA, 2003.

[3] Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: properties enhancement. International Food Research Journal., vol. 16, pp. 1-9.

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE PESCADO Y ACEITE DE PESCADO ENCAPSULADO EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE POLLOS DE ENGORDE (ROSS).

*Baños-Lara, G., Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., González-Olivares, L.G. y Jaimez-Ordaz, J.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Carr. Pachuca-Tulancingo, km. 4.5. Mineral de la Reforma, Hgo., C.P. 42184

*Autor para correspondencia: geo21bala@gmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La formulación de las dietas para aves de corral juega un papel muy importante en la industria avícola diversos estudios han demostrado que ésta determina en gran medida la salud de los mismos, así como los parámetros productivos de las aves [1-3]. Es por ello, que se han buscado otras alternativas de alimentación que permitan obtener los mejores rendimientos en el sector productivo, una de ellas es la suplementación de dietas, la cual consiste en enriquecer los requerimientos nutricionales en la alimentación. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con encapsulados de aceite de pescado sobre los parámetros de crecimiento de pollos de engorde. Se trabajó con un grupo de 45 pollos de engorde Ross divididos en tres grupos codificados como AP, APE y C. La dieta de las aves del grupo AP se suplementó con aceite de pescado directamente en el pico; la dieta de las aves del grupo APE se suplementó con encapsulados de aceite de pescado (cápsulas de 1 g); mientras que las del grupo C fueron las aves control. Todos los grupos tuvieron agua y alimento balanceado comercial disponible durante el tiempo que duró el estudio. Los parámetros evaluados fueron ganancia de peso (GP), consumo de alimento y agua (CAL y CAG), conversión alimenticia (CA, kg de alimento consumido/kg peso ganado) y rendimiento del canal (RC). Estos parámetros se evaluaron en tres etapas, a partir de su nacimiento: adaptación (2-4 semanas), iniciación de suplementación (4-6 semanas) y finalización (6-7 semanas). Los valores promedios en la etapa de finalización fueron: • Grupo AP: 1996 g en GP, 194 g en CAL, 284 g en CAG, 0.79 en CA y 79.68% en RC. • Grupo APE: 1843 g en GP, 209 g en CAL, 275 g en CAG, 0.60 en CA y 73.50% en RC. • Grupo C: 1817 g en GP, 216 g en CAL, 216 g en CAG, 0.81 en CA y 72.83% en RC. Los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, los mejores resultados los obtuvieron los grupos suplementados en comparación del grupo control, y esto se puede observar en el consumo de alimento principalmente. Los parámetros productivos de las aves pueden ser mejorados tomando en cuenta la suplementación de dietas con ácidos grasos omega 3, que son una alternativa para el mejoramiento de los parámetros productivos.

Palabras clave: Suplementación; ácidos grasos omega 3; pollos de engorde; ganancia de peso; conversión alimenticia.

REFERENCIAS

[1] R. Gonzalez-Esquerra and S. Leeson, "Effect of Feeding Hens Regular or Deodorized Menhaden Oil on Production Parameters, Yolk Fatty Acid Profile, and Sensory Quality of Eggs", Poult. Sci., vol. 79, pp. 1597–1602, 2000.

[2] R. González-Esquerra and S. Leeson, "Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids", Can. J. Anim. Sci., vol. 81, pp. 295–305, 2001.

[3] Saleh, H., Rahimi, Sh.*,Karimi Torshizi, M. A., "The effect of diet that contained fish oil on performance, serum parameters, the immune system and the fatty acid composition of meat in broilers." Int. J. Vet. Res., vol. 2 pp. 69-75, 2009.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO DEL INÓCULO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR LA LEVADURA *Xanthophyllomyces dendrorhous.*

Farías-Álvarez, L.J., Gschaedler-Mathis, A., Arellano-Plaza, M., Amaya-Delgado, L., y *Herrera-López, E.J.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Biotecnología Industrial, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, México 45019.

*Autor para correspondencia: eherrera@ciatej.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous,* es una de las fuentes microbianas más reconocidas para la producción de la astaxantina. Los rendimientos, productividad, calidad de los bioproductos de esta levadura dependerán del estado metabólico del inóculo. Por lo que, en este estudio reportamos el efecto que tiene el tiempo de crecimiento del inóculo sobre la cantidad de carotenoide obtenido. Se llevaron a cabo una serie de cultivos durante 120 horas de fermentación, partiendo de dos inóculos con diferentes tiempos de crecimiento cada uno (10 y 36 horas respectivamente). En la fermentación a partir de un inóculo de 36 horas de crecimiento se alcanzó una mayor población celular (120 x 10^6 células/mL), se agotó la fuente de carbono en un menor número de horas (36 h) y se obtuvo una producción de astaxantina mayor (1600 µg/mL) en comparación con la fermentación a partir del inóculo con 10 horas de incubación.

Palabras clave: Astaxantina; carotenoides; fermentación; *Xanthophyllomyces*; inóculo.

INTRODUCCIÓN

La astaxantina (3,3 '-dihidroxi - β, β - caroteno - 4,4' - diona) es un carotenoide ampliamente distribuido en la naturaleza y es el pigmento principal en los crustáceos y los salmónidos [1], así como diversas aves como el flamingo y el ibis escarlata [2].

La astaxantina se usa como pigmento para la acuicultura e industria de aves de corral, debido a que estos animales no pueden sintetizarla por sí mismos, por lo tanto, ésta debe ser incluida en sus alimentos para su adecuado crecimiento y reproducción [1]. La astaxantina tiene una alta actividad antioxidante generado interés en la industria farmacéutica [3], por ejemplo para la prevención de algunos tipos de cáncer [4]. La astaxantina producida por tecnología química sintética ha representado cerca del 97% de las ventas totales [5]. Sin embargo, algunos de los subproductos pueden tener efectos secundarios para el consumidor. *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes *Phaffia rhodozyma*) ha sido objeto de extensas investigaciones como una fuente microbiana alternativa para la producción de astaxantina.

El estado fisiológico de las células afecta la producción del metabolito [6]. Por ejemplo, la levadura *Saccharomyces cerevisae* a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento sufre una serie de cambios en su morfología, fisiología y composición. Dependiendo de la edad del inóculo, estos cambios tienen un

gran impacto sobre el rendimiento de la fermentación de la masa en el proceso de panificación [7]. De manera similar, la levadura *X. dendrorhous* también atraviesa por diferentes condiciones metabólicas durante la producción de la astaxantina [8], por lo que, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que tiene utilizar inóculos con diferentes tiempos de crecimiento durante la producción de astaxantina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fermentaciones a nivel matraz con diferentes tiempos de inóculo

Se llevó a cabo un pre-inóculo en dos matraces de 125 mL con 25 mL de medio químicamente definido a partir de dos crioviales (1.5mL) de la cepa 25-2, de *X. dendrorhous*. Se cultivaron por 48h en un orbital New Brunswick® Innova 44 a 20 °C y 250 rpm. Del pre-inóculo anterior se tomaron 10 mL de medio y se pasaron a dos matraces de 500 mL con 100 mL de medio químicamente definido y se dejaron crecer a 20 °C y 250 rpm durante dos diferentes periodos de tiempo, 10 y 36 horas, definidos previamente. Después, 10 mL del inóculo se llevaron a matraces de 500 mL con 100 mL de medio químicamente definido para cada tiempo de inóculo (10 y 36 horas) por triplicado, y se siguió la fermentación a lo largo de 120 horas, a 20 °C y 250 rpm en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44, tomando muestra cada 6 horas para realizar las pruebas

Determinación del crecimiento celular

Para todos los experimentos, el crecimiento de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* se cuantificó mediante una cámara Neubauer marca Marienfeld®, utilizando un microscopio Leica® CME.

Determinación de azúcares

Para la cuantificación de azúcares consumidos se utilizó el método del ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller y col. [9]. Para la curva de calibración se preparó una solución de glucosa a 2 g/L, y se hicieron diluciones, tomando alícuotas con concentraciones de 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 g/L. Se colocó 100 µL de cada alícuota y 100 µL de DNS, se agitaron y colocaron en baño María por 5 minutos y se enfriaron para detener la reacción. Se agregaron 800 µL de agua destilada y se agitaron. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro de micro placas xMark™ de Bio-Rad® a 540 nm. De acuerdo con las absorbancias obtenidas de las diluciones de la solución patrón, se realizó una regresión lineal de la gráfica Absorbancia vs Concentración para determinar cuantitativamente los azúcares reductores.

Cuantificación de carotenoides totales

Para la determinación de la concentración de carotenoides totales en las muestras obtenidas durante la experimentación realizada en este trabajo se siguieron los pasos a continuación:

Se tomó 0.5 mL de muestra (duplicado) en un microtubo y se colocó en una centrifuga Labnet® Prismir durante 5 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante fue recuperado y almacenado en un congelador Torrey® para ser utilizado en pruebas posteriores, la pastilla celular fue lavada dos veces con 0.5 mL de agua destilada. Posteriormente se retiró el sobrenadante, la extracción de los carotenoides totales fue realizada de acuerdo a la técnica descrita por Sedmark y col. [10], con algunas modificaciones. Al microtubo con la pastilla celular se le agregó 0.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a una temperatura de 55°C y se le aplicó un pulso con un sonicador de vástago Ultrasonic Processor® GEX130 para rompimiento de la pared celular. Se homogenizó por 1 minuto con ayuda de un vortexy se le adicionó 0.1 mL de buffer fosfato de sodio (10 mM, pH 7) y 0.8 mL de una mezcla de acetato de etilo: hexano 1:1 (v/v) y se volvió a homogenizar por un 1 minuto. La fase orgánica y la fase acuosa fueron separadas

centrifugando el microtubo durante 1 minuto a 13,000 rpm. Posteriormente, la fase orgánica fue trasvasada a un nuevo microtubo y se colocó en un concentrador a vacío Thermo Scientific® DNA 120 por 30 minutos, para remover el solvente donde los carotenoides están disueltos. Posteriormente, el microtubo fue extraído del concentrador a vacío y los carotenoides se re-suspendieron en 0.5 mL de isopropanol. Finalmente, se midió la absorbancia de los carotenoides suspendidos en isopropanol a 480 nm en un espectrofotómetro de micro placas xMark™ de Bio-Rad. La concentración de carotenoides totales fue calculada de la siguiente forma:

Concentración de Carotenoides (µg/L) = $(A \cdot V_1 \cdot 1x10^7) / (E \cdot L \cdot V_2)$
donde:
A= Absorbancia de la muestra a 480 nm
V_1= Volumen del sobrenadante (mL)
V_2= Volumen inicial de la muestra (mL)
L= Trayecto Óptico (0.625 cm)
E= Coeficiente de Extinción Molar (2150)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento celular

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de las fermentaciones realizadas con diferentes tiempos de inóculo. En la **Figura 1**, se observa la cinética de población celular obtenida a partir de conteo en cámara de Neubauer. Se observan diferencias en los tiempos a los cuales se desarrollan las fases de crecimiento de la levadura *X. dendrorhous*. Se detecta una fase de latencia de 6 y 24 horas (Inóculo de 36 y 10 horas respectivamente), una fase exponencial pronunciada para los experimentos con el inóculo de 36 horas. La cinética del inóculo de 10 tardó 72 horas en llegar al máximo de crecimiento y alcanzar la fase estacionaria. Cabe destacar que la cantidad máxima de población fue alcanzada en el experimento con inóculo de 36 (120 x 10^6 células/mL), y en un tiempo de 48 horas, demostrando que las células provenientes de este inóculo se encuentran en un mejor estado fisiológico y presentaron un menor tiempo de adaptación y un crecimiento más acelerado con respecto las levaduras provenientes del inóculo de 10 h.

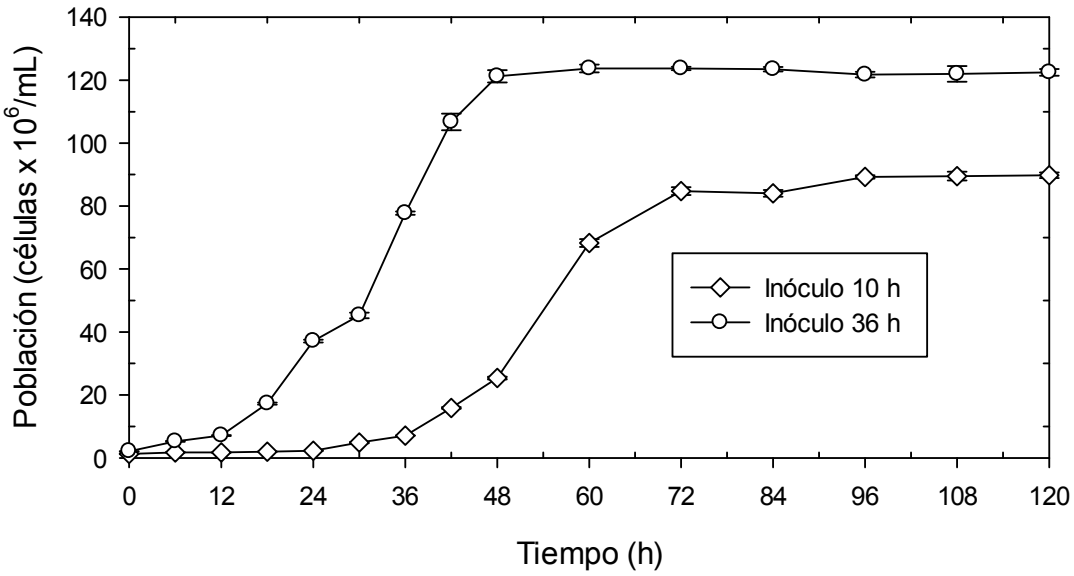


Figura 1. Cinéticas de crecimiento celular

Consumo de sustrato

En la **Figura 2** observamos el comportamiento en el consumo de sustrato para ambas cinéticas que se llevaron a cabo. Podemos ver cómo se llega a consumir totalmente el sustrato a las 36 y 72 horas (Inóculo de 36 y 10 horas respectivamente). Dicho comportamiento denota un mejor estado fisiológico en las fermentaciones con inóculo de 36 horas, hablando estrictamente para la asimilación de sustrato y crecimiento (**Figuras 1 y 2**).

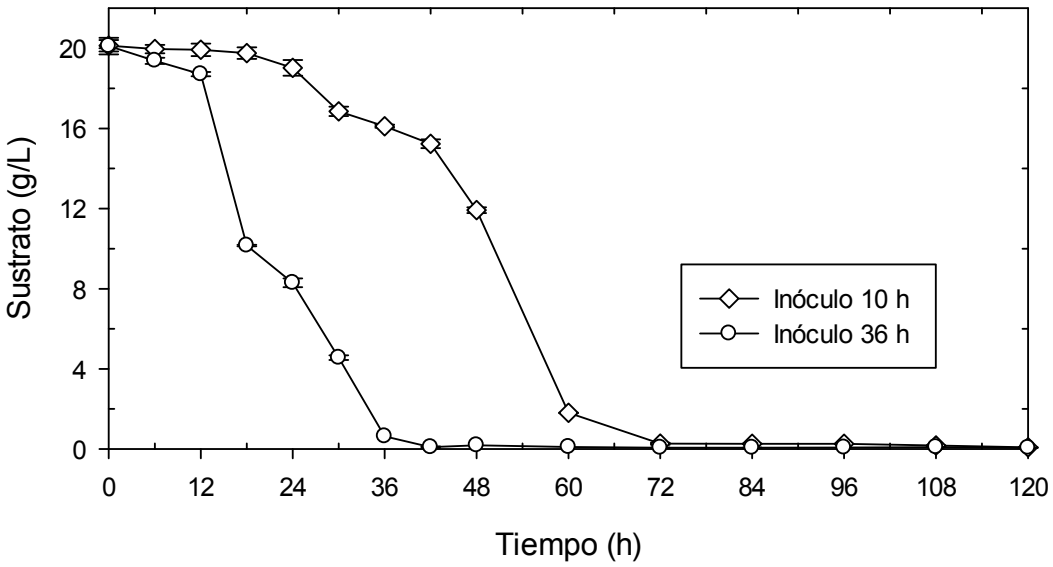


Figura 2. Cinéticas de consumo de sustrato

Producción de carotenoides

La cinética de producción de carotenoides totales se muestra en la **Figura 3**, se observan diferencias importantes en la generación de carotenoides para los diferentes tiempos de inóculo. La fermentación con la mayor producción (1600 µg/mL) fue la del inóculo de 36 horas, también cabe señalar que en dicha cinética la producción cesó hasta las 108 horas. El comportamiento mostrado anteriormente corrobora la existencia de diferencias significativas en producción de metabolitos, en este caso carotenoides, dependiendo de la edad del cultivo que se emplea para la inoculación.

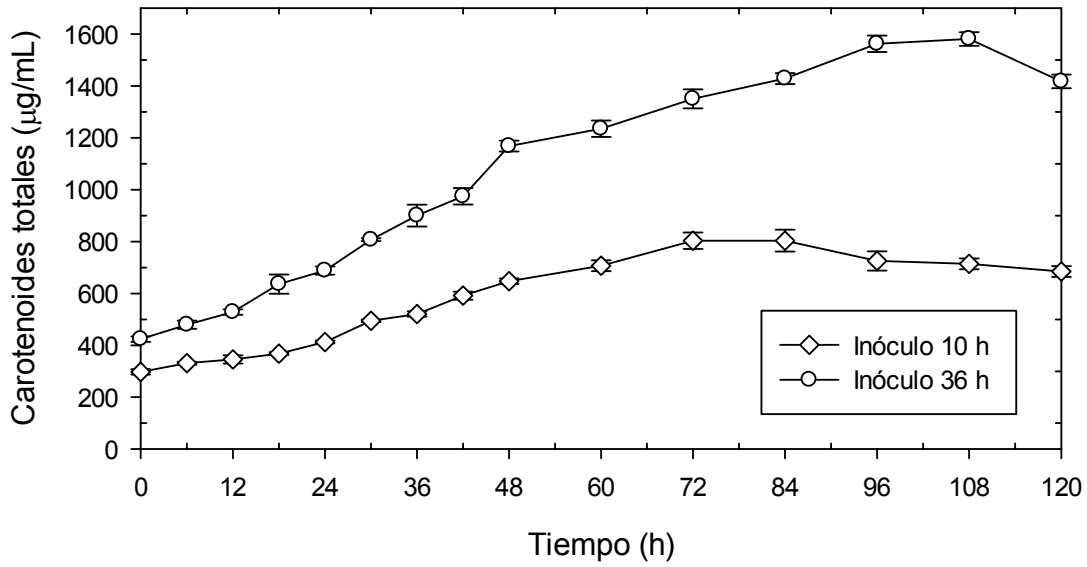


Figura 3. Cinéticas de producción de carotenoides

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra la importancia que tiene la edad del inóculo sobre la capacidad fermentativa y la producción de metabolitos de la levadura *X. dendrorhous.* La cinética con un inóculo de 36 horas presentó la máxima producción de carotenoides, una mayor velocidad de asimilación de sustrato y un crecimiento superior. Una posible explicación a esta diferencia de rendimientos es, que la levadura a este tiempo de inóculo se encuentra en etapa exponencial y por lo tanto metabólicamente más activa en comparación con la levadura con 10 h de crecimiento en donde apenas está terminando de adaptarse al medio. Podemos concluir que emplear un inóculo con una edad de 36 h para producción de astaxantina se incrementará la cantidad a obtener de este carotenoide en comparación con un tiempo de inóculo de 10h.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al fondo de sustentabilidad energética y CONACYT-SENER por el apoyo 245750.

REFERENCIAS

[1] I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea, "Astaxanthin: a review of its chemistry and applications.," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 46, no. 2, pp. 185–96, 2006.

[2] G. R. Lorenz, R.T., Cysewski, "Commercial potential forHaematococcusmicroalgae as a natural source of astaxanthin.," *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 160–167, 2000.

[3] M. Guerin, M. E. Huntley, and M. Olaizola, "Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition," *Trends Biotechnol.*, vol. 21, no. 5, pp. 210–216, 2003.

[4] H. Nishino, M. Murakoshi, H. Tokuda, and Y. Satomi, "Cancer prevention by carotenoids," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 483, no. 2, pp. 165–168, 2009.

[5] L. E. Frucht and S. Kanon, "Israel grows red algae in the dessert to fight disease," 2005.

[6] C. G. Gabrielă and V. Daniela, "The influence of different forms of backery yeast Saccharomyces cerevisie type strain on the concentration of individual sugars and their utilization during fermentation," *Rom. Biotechnol. Lett.*, vol. 15, no. 4, pp. 5417–5422, 2010.

[7] M. N. Rezaei, E. Dornez, P. Jacobs, A. Parsi, K. J. Verstrepen, and C. M. Courtin, "Harvesting yeast (Saccharomyces cerevisiae) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation," *Food Microbiol.*, vol. 39, pp. 108–115, 2014.

[8] A. Xiao, X. Jiang, H. Ni, Q. Yang, and H. Cai, "Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation during Phaffia rhodozyma fermentation," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 148–153, 2015.

[9] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, Mar. 1959.

[10] J. J. Sedmark, D. K. Weerasinghe, and S. O. Jolly, "Extraction and quantification of astaxanthin from Phaffia rhodozyma," *Bio-technol Tech*, vol. 4, pp. 107–112, 1990.

SIGNIFICADO EVOLUTIVO Y ECOLOGICO DE LA PARALOGIA EN ENZIMAS OXIDASAS DEPENDIENTES DE COBRE EN BACTERIAS. (EVOLUTIVE AND ECOLOGICAL MEANING OF THE PARALOGY IN DEPENDENT COPPER OXIDASE ENZYMES IN BACTERIA).

[1,2*]Brena-Becerril, Alejandro., [3]Vinuesa, F.P., y [4]Valderrama-Blanco, M.B.

1. Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 N° 595 carretera Tlajomulco Santa Fe, Lomas de Tejeda, Tlajomulco de Zúñiga. Jal., Mex.
2. Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Jalisco. Plantel 16, Km 3.2 Carretera a San Isidro Mazatepec. Santa Cruz de las Flores, Tlajomulco de Zúñiga, Jal. CP45640
3. Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Cuernavaca, Mor., Mex.
4. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Mor., Mex.

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com; abrena.cecytej@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Las oxidasas de cobre se han diversificado de manera notable. En hongos su función es la de oxidasas, en bacterias cumplen funciones diferentes: oxidasas, y secuestradoras de cobre. Esta diversidad se ve reflejada en sus propiedades catalíticas: En tres enzimas homologas caracterizadas varían notablemente el tipo de sustratos, en sus constantes catalíticas, así como en su función biológica. En la comparación de secuencias por alineamiento, en una misma especie encontramos más de dos variantes de la enzima de esta subfamilia. En este trabajo abordamos este fenómeno destacando el significado evolutivo de la enzima desde dos puntos de vista: Como evolución divergente, que genera nuevas funciones biológicas, pero conserva siempre la geometría del sitio trinuclear y como eventos de duplicación antes de la especiación que se han adaptado y evolucionado en hábitats y nichos ecológicos más diversos, por lo que presentan propiedades catalíticas variadas, como: termo tolerancia, utilización eficiente de sustratos no fenólicos, resistencia a álcalis y tolerancia a haluros. Esto quizá sea una explicación de su doble y hasta cuádruple presencia en una misma especie, que a nivel de estructura primaria encontramos como paralogía y este fenómeno lo encontramos más difundido especialmente en proteobacterias.

Palabras clave: Oxidasas multicobre, Evolución modular, Paralogía.

ABSTRACT

Copper oxidases have been remarkably diversified. In fungi their function is that of oxidases, in bacteria they fulfill different functions: oxidases, and copper sequesters. This diversity is reflected in its catalytic properties: In three homologous enzymes characterized, the type of substrates, their catalytic constants, and their biological function vary considerably. In the comparison of sequences by alignment, in the same species we found more than two variants of the enzyme of this subfamily. In this work we approach this phenomenon highlighting the evolutionary meaning of enzymes from two points of view: As a divergent evolution, which generates new biological functions but always conserves the geometry of the trinuclear site. Y As events of duplication before speciation that have adapted and evolved in diverse habitats and ecological niches more diverse, for which they have varied catalytic properties, as:

thermo tolerance, efficient use of nonphenolic substrates, resistance to alkalis and tolerance to halides. This is perhaps an explanation of its double and even quadruple presence in the same species, which at the level of primary structure we find as paralogy and this phenomenon we find it more widespread especially in proteobacteria.

Keywords: multicopper oxidases, modular evolution, paralogy in gene and protein.

INTRODUCCIÓN

En la industria las oxidasas y lacasas tiene variadas aplicaciones; como biocatalizadores, como degradadoras de lignina, en blanqueamiento de textiles y vinos, y en la depuración de efluentes [1,2].

Una las potenciales aplicaciones de la lacasa es la biorremediación de suelos, eliminando los contaminantes sólidos, hidrocarburos aromáticos y cloro fenoles. [3,4,5] Seguida de la generación de biocombustibles como el bioetanol mediante la degradación de bagazo de caña, fécula de maíz o yuca. Aunque la enzima es una enzima cardinal y prometedora gracias a su variedad de usos industriales no es completamente estable en aplicaciones que conlleven temperaturas altas en su proceso [6,7,8,9].

Debido a las limitaciones en las lacasas fúngicas y a su especificidad, su búsqueda en otros reinos y clase de organismos, con diferente y nueva actividad de estas enzimas, puede tener impacto en diversas tecnologías ambientales y biotecnológicas de ahí la necesidad de explorar las lacasas en bacterias, un campo recién explorado [4].

Las oxidasas dependientes de cobre o multicobre (MCOs) son una familia de enzimas que incluye a las lacasas, las ascorbato oxidasas, las ceruloplasminas y las bilirrubin oxidasas. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en bacterias, hongos, plantas, insectos y animales [10]. Las MCOs son metaloenzimas que contienen de uno a seis átomos de cobre por molécula y entre 100 a más de 1600 residuos de aminoácidos en una sola cadena polipeptídica [11,12] En general, las MCOs poseen una arquitectura molecular y modular común, la cual se reveló gracias a la cristalografía de rayos X de diferentes miembros de ésta familia. El análisis conformacional indica que estas enzimas contienen tres dominios cupredoxina ordenados de manera secuencial (I-III o A, B, C) y organizados en una estructura globular alrededor del sitio catalítico [13]. A pesar de esto, las MCOs poseen una gran diferencia intraproteína, lo que las clasifica en los diferentes subgrupos, proporcionándoles además diferentes funciones fisiológicas y bioquímicas. Por ejemplo, las ascorbato oxidasas están involucradas en síntesis de pigmentos y la diferenciación específica de tejido en plantas, mientras que las lacasas participan en procesos de patogénesis, producción de pigmentos, degradación de material lignocelulósico, entre otros [13]. Hasta el momento se han aislado y caracterizado un gran número de genes de MCOs, particularmente de especies fúngicas. La multiplicidad de genes es una característica común en hongos. Éste fenómeno se ha descrito ampliamente en basidiomicetos, aunque la producción de lacasas se ha reportado en ascomicetos como *Myceliophtora thermophyla* y *Trichoderma atroviride*. [13,14] Sin embargo, en estas especies no se han descrito otros miembros de la familia de MCOs. Hoy en día, gracias a la disponibilidad de secuencias genómicas es posible la identificación *in silico* de genes que codifican para MCOs. En éste contexto, se reporta similitudes de secuencias bacterianas homologas a otras, encontrando, por ejemplo, en el genoma de *Coprinopsis cinerea* 17 genes de MCOs, los cuales codifican para lacasas en sentido estricto [15]. El análisis BLASTn realizado sobre el genoma de *Aspergillus niger* ATCC 1015 reveló la presencia de 13 genes de MCOs, los cuales fueron clasificados en 3 diferentes subgrupos considerando la relación filogenética [16]. En la bacteria *Nitrosomonas europaea* un simple análisis BLASTp arroja 20 proteínas clasificadas como MCO´s

y oxidasas de cobre azul (Blue Cooper oxidase) BCO, que ya depuradas, las que conservan los aminoácidos típicos de lacasas son 4 diferente. Este tipo de análisis ha permitido la clasificación de los genes de MCOs en diferentes especies fúngicas, generando la base para estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares. En bacterias no se han caracterizado bioquímicamente de manera contundente las diferentes funciones de estas proteínas con funciones ancestrales [17].

A medida que las especies divergieron a partir estas células ancestrales, cada nueva especie se aleja aún más y da origen a formas y funciones diferentes en cada especie de enzimas como tubulinas hemoglobinas, oxidasas, etc., la similaridad en las secuencias de una familia de genes o proteínas sugiere una secuencia ancestral común, por lo que se consideran homologas, en éste estudio parálogas y las surgidas de la especiación serán ortólogas, estas últimas secuencias serán las que compartan la misma función. En células bacterianas cuyos genomas poseen pocos intrones y regiones intergénicas cortas, la mayoría de las secuencias de genes que codifican una proteína pueden hallarse rastreando las secuencia en marcos abiertos de lectura de longitudes significativas (>100 codones). Con análisis de los ORF se identifican en bacterias y levaduras en 90% de genes similaridad con sus proteínas conocidas [17].

La presencia de varios genes semejantes que codifican para una proteína o un tipo determinado de proteínas, como una familia génica, son genes homólogos porque se han originado a partir de un ancestro común. También podemos encontrar genes homólogos originados por un proceso de especiación, el mismo gen en especies distintas, son genes ortólogos. Y por otra parte podemos encontrarnos con genes homólogos diferentes, cuyo origen se encuentra en una duplicación dentro de una especie, son genes parálogos. Pero no es tan sencillo, las relaciones de ortología y paralogía se establecen entre parejas de genes, o proteínas, una secuencia particular puede tener su ortólogo en una especie próxima y ser parálogo a copias de su misma especie o a genes y proteínas de otras especies, siempre que la duplicación se haya producido antes de la especiación. Los genes y proteínas parálogas tienen un mismo origen, pero nuevas funciones. Los genes que ocupan el mismo locus en diferentes especies, y las proteínas producto de esos genes, se llaman *ortólogos*, mientras que genes de diferentes loci, pero relacionados por duplicación de genes son designados *parálogos*. La filogenia de las especies puede reconstruirse solo comparando los genes ortólogos. Las diferencias entre genes parálogos de diferentes especies no están relacionadas con el tiempo desde la divergencia, sino con el tiempo desde la duplicación de los genes [18].

Son ortólogos cuando esta similitud deriva de una ascendencia común (relación vertical), y son parálogos cuando la similitud se produce dentro del mismo genoma por duplicación de un gen (relación horizontal). Se asume que dos genes ortólogos tienen la misma función, mientras que los genes parálogos, puesto que se han originado por duplicación y posterior divergencia, deben de tener diferente función o, al menos, cierto grado de especialización [18], también se observó apoyado en otros autores en el análisis bidimensional y el de agregados hidrológicos de las secuencias aminoácidas, que existen duplicados internos de estas proteínas, que existieron eventos ancestrales de duplicaciones intragénica. Kumar *et al* [23] reporto este fenómeno a nivel intramolecular, pero mediante la prueba de HCA, se demostró que este fenómeno de recombinación también ocurrió en bacterias. Por la baja identidad entre las secuencias y dóminos duplicados no se pudo relacionarlos, pero ahora se comprueba que la duplicación ocurrió antes del proceso de especiación, a partir de una única lacasa ancestral para procariotas y eucariotas. Reorganizándose de manera diferente las estructuras, pero conservando altamente los residuos ligados a centros catalíticos. Es decir, estas proteínas oxidasas, de plantas, hongos y bacterias, comparten aparatos catalíticos similares tipo lacasa.

Las variaciones evolutivas de una proteína, aportan mucha información sobre la proteína en sí misma. La evolución divergente hacia distintas especies resulta en variaciones de la misma proteína, con esencialmente la misma función biológica pero diferente secuencia. Las diferencias y similitudes en la secuencia reflejan la conservación necesaria para estructura y función para esa proteína. Las relaciones evolutivas nos dan indicios del rol biológico de proteínas no caracterizadas. Proteínas que son muy similares en estructura y secuencia pueden llevar a cabo funciones distintas, y proteínas con estructuras distintas pueden tener funciones idénticas. Se sabe que la función y la estructura tridimensional están íntimamente relacionadas.

Entender la evolución de la función puede aportar datos para el diseño de proteínas con funciones nuevas [13]. Existen diversas formas de variación o de modificación de las proteínas, entre ellas: a) Mutaciones y estructura proteica b) Elongación proteica por duplicación intragénica c) Fusión de genes
Las proteínas con cobre son ancestrales y ubicuas, siendo las oxidasas multicobre una de las más distribuidas en los seres vivos. Se denominan multicobre pues contienen tres diferentes núcleos metálicos que participan coordinadamente en la catálisis, sin embargo, la familia posee otras funciones diferentes a la función redox [13]. Algunos miembros de la familia son secuestradoras de cobre, otras pertenecen a cascadas regulatorias y algunas otras participan en la desintoxificación celular como parte de sistemas de extrusión de cobre. Esta diversidad de función, así como la conservación del plegamiento han dado lugar a una variedad muy interesante de arreglos de sitios de unión de cobre. El entendimiento de la evolución de esta familia nos aportará información muy valiosa para el diseño y manipulación de parámetros catalíticos en sistemas modelo.

MATERIALES Y MÉTODOS
Para la búsqueda de secuencias, se utilizaron computadoras personales (PC) y se refinaran los trabajos en las centrales de computo de mayor capacidad del Centro de Ciencias Genómicas (CCG de la UNAM) tiene un clúster de 27 nodos con procesadores Xeon duales a 2.4 MHz, 2MB de RAM y tecnología hyperthreading, con sistema operativo es Linux-Rocks. Con el fin de establecer una metodología de análisis Bioinformático se usaron programas bioinformáticos de libre acceso en la red como Clustal W [19], Clustal X [20], Muscle [21], Bioedit [22], Mega [23]. Para obtener las secuencias proteicas bacterianas, en los bancos de datos de proteínas, se utilizaron como sondas secuencias proteicas de enzimas oxidasas caracterizadas diferentes, nombradas por las siglas en inglés y conocidas como: Polifenol oxidasa (PPO1)[24,25], Oxidasas de cobre A (Copper oxidase A(CotA)[26,27], Oxidasa de flujo de cobre [Cu Efflux Oxidase (CueO)[28,29] y fenol oxidasa extracitoplásmica [Extracitoplamic phenol oxidase (EpoA)[30] caracterizadas en las bacterias *Marinomonas mediterranea, Bacillus subtilis, Escherichia coli y Streptomyces griseus,* respectivamente que son oxidasas con actividad similar a Lacasas fúngicas, y se encuentran depositadas en el banco de datos con Números de Acceso: AAF75831, NP388511, NP752102 y BAB64332 respectivamente. Además, sus secuencias forman parte de proyectos genómicos. De estas también se utilizó la estructura secundaria y tridimensional registradas en la Base de datos de proteínas (Protein Data Bank) conocido como PDB con identificador: 1GSK o UVW1 para CotA y 1PF3 y 1N68 para CueO. La depuración de las secuencias se realizó visualmente, seleccionando aquellas que tuvieran completos los patrones característicos de residuos aminoácidos ligados a la actividad de oxidasas dependientes de cobre y las que en los primeros árboles o diagramas estuvieran repetidas. Se eliminaron las secuencias que no contenían los cuatro sitios conservados con histidinas, típicas de las oxidasas de cobre trinucleares, así como las secuencias redundantes de acuerdo a firmas descritas por Valderrama [13].

Análisis de diagramas de relaciones. Con los mejores alineamientos, se obtuvieron diagramas de relaciones tanto de distancias como máxima verosimilitud para proteínas, incluidos en los programas Bioedit, Clustal X y se compararon los resultados de los diferentes árboles para establecer relaciones. Con base en estas ramas se ubicaron los diferentes grupos con probables funciones diferentes para su análisis.

Criterios y variables estadísticas.

Búsqueda de secuencias: Puntuación de alineado (Matriz) y valor E (Confianza por azar)

- Alineamiento: Matrices empíricas de proteínas: Blosum, PAM, WAG.[33,34,35]
- Construcción del árbol: Modelos de distancias, máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana
- Evaluación del árbol: Remuestreo de ramas por Bootstrap (para evalúar robustez)
- Máxima verosimilitud. Ln d=p(D/H):

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de los grupos de la colección. Se seleccionó una colección de 142 secuencias homólogas a las oxidasas que se utilizaron como sonda, que cubren diferentes clases taxonómicas. Luego, a ésta colección se agregaron las secuencias bacterianas caracterizadas hasta ese momento, más algunas oxidasas vegetales y fúngicas para aumentar las distancias y poder ordenar mejor y enraizar el árbol. Apoyándose en los primeros diagramas de relaciones, se realizó nueva selección de secuencias de las diversas ramas, eliminando las similares o repetidas, quedándonos con una colección de 103 secuencias con la que se realizó la optimización de alineamientos. Al final para simplificar las ramas, se realizó una selección de 72 secuencias más representativas de las diferentes ramas que presentamos en el diagrama de árbol, observando congruencia entre los diversos diagramas construidos, con ésta selección, y aparta claramente los diferentes grupos de probables funciones de oxidasas multicobre bacterianas en ramas separadas, coincidiendo estos grupos también con las diferentes ramas de diagramas obtenidos por Hoegger *et al*., 2006 que separa rama de lacasas de *B. subtilis* CotA, la rama de resistencia a cobre crp (copper resistance protein) y en otra rama *Bacillus halodurans* y cercanas a ella como *B. thuringiensis* y todas coinciden con la identificación de patrones de Valderrama [13, 24,26] (Ver Fig. 1).

Resultado de los diferentes alineamientos múltiples con los programas Clustal X, Muscle y Bioedit, refinados manualmente, se confirmó que los únicos residuos de aminoácidos conservados al 99% en todas las secuencias, corresponden a 10 histidinas y una cisteína ligadas a sitios activos, y esto coincide con lo indicado por diversos autores [13,24,26]. Observamos que, alineando las secuencias de las ramas por separado, se observan regiones o bloques con mayor homología, que podrían ser los módulos de residuos conservados específicos de cada grupo, esto nos permitió separar claramente dos grupos en la clase *Fermicutae* y en el género *Bacillus* (Fig. 1 y Fig. 2). y únicamente en la clase proteobacteriae, se identificaron secuencias parálogas pertenecientes a la misma especies ubicadas en diferentes ramas del árbol, algunas pertenecen al tipo de resistencia a cobre y otras cercanas a las lacasas típicas, que ilustramos en la fig. 1 con Bradyrhizobium, Pseudomonas Burkholderia y Nitrosomonas, que diferenciamos agregando letras minúsculas al final, fenómeno que no se encontró en las oxidasas de otros géneros, ni en *Bacillus,* que fue otra razón por la que interesa su estudio, comportamiento y actividad.



CLAVE DE COLORES DE CLASES Y GÉNEROS BACTERIANOS DE OXIDASAS
PROTEOBACTERIAS: Alfaproteobacterias ⬭ Beta proteobacterias ⬢ Gamaproteobacterias ⬬
Deltaproteobacterias ⬢ **FIRMICUTES**: Bacilliales □ Lactobacilliales ■
ACTINOBACTERIAS Styreptomycetae ◆ Corynebacteraceae ◆ Mycobacteriaceae ◆
CHLOFLEXI: Chloroflexus ▼ **AQUIFICAE**: Aquifex ▼ **EUARCHEA**: Haloarcula ▽
CREANARCHEA: Pyrobaculum ▼ **Plantae** ▲ **Fungi**. ▲
Rama en líneas azul: Proteínas resistencia a cobre (crp, crtp, copA). Rama línea verde: MCO caracterizadas Grupo Bacillus subtilis Rama línea roja: No caracterizados Grupo *Bacillus thuringiensis* probablemente similares a lacasa alcalina.

Fig. 1. Diagrama de máxima verosimilitud generado con Bioedit y editado con MEGA. De la selección de oxidasas bacterianas y su clara diferenciación con lacasas fúngicas y de plantas

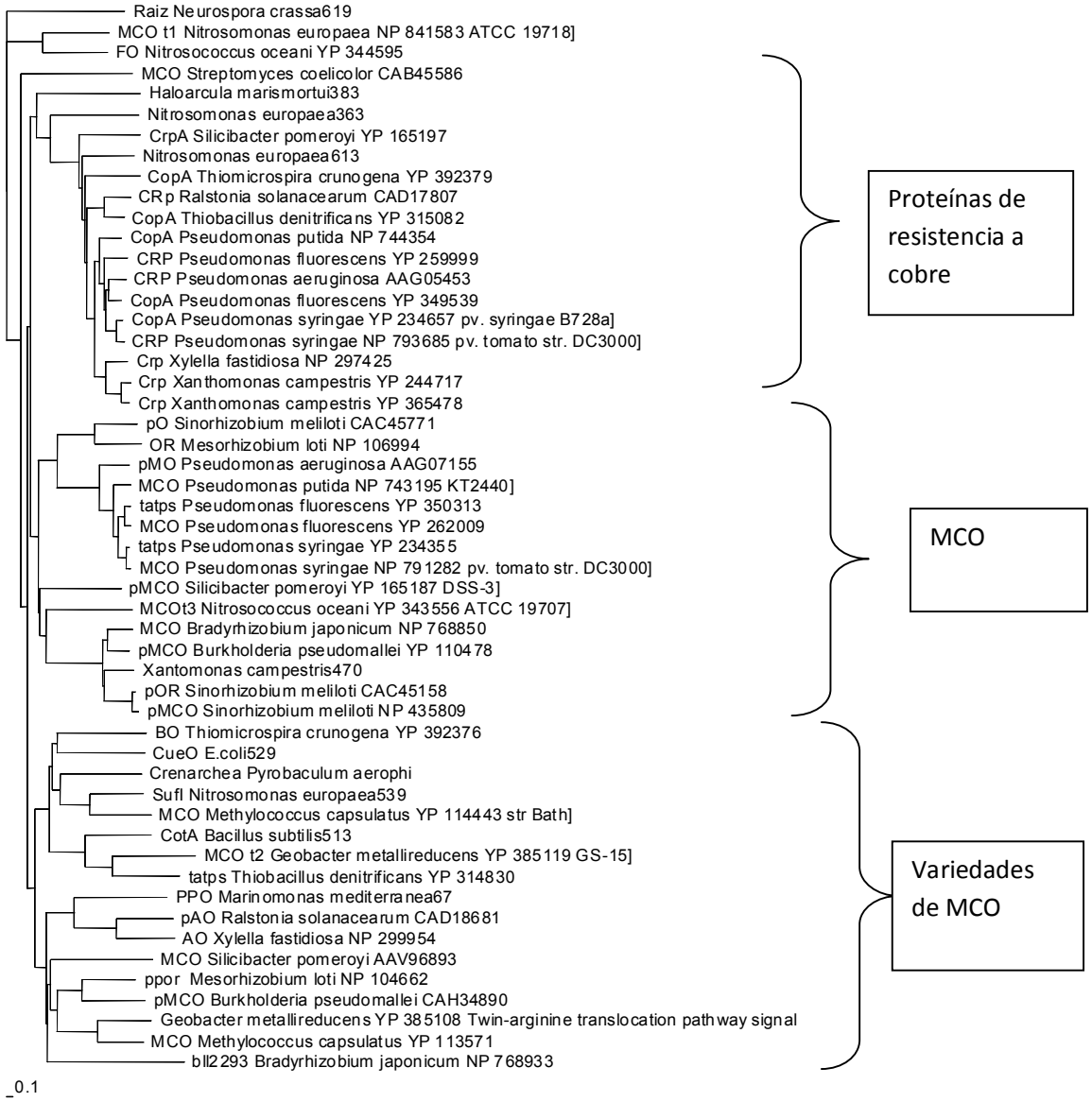


Fig. 2 Diagrama de máxima verosimilitud generado con Bioedit y editado con MEGA, de secuencias parálogas bacterianas en diferentes ramas diferenciado sus funciones probables, enraizadas con Hongo lacasa *Neurospora*.

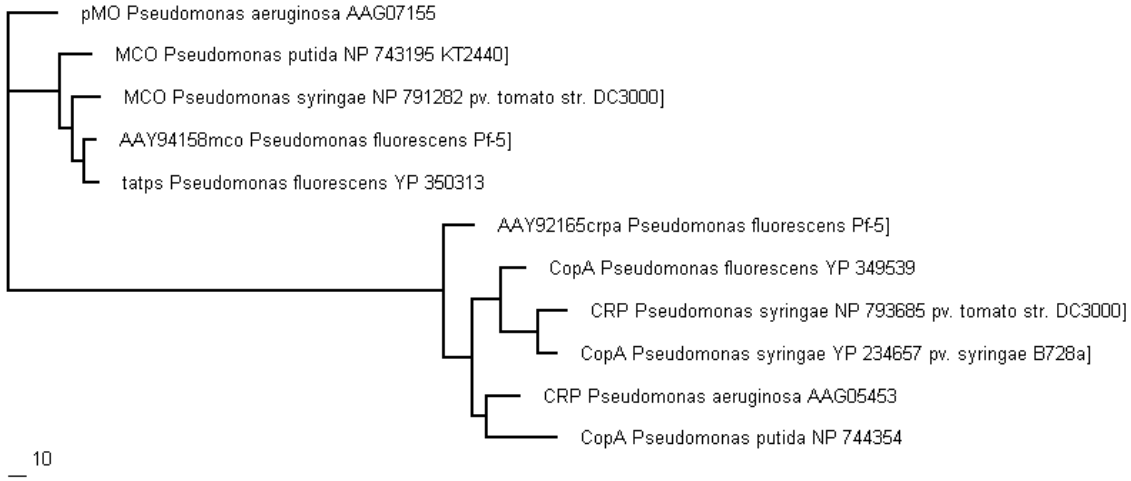
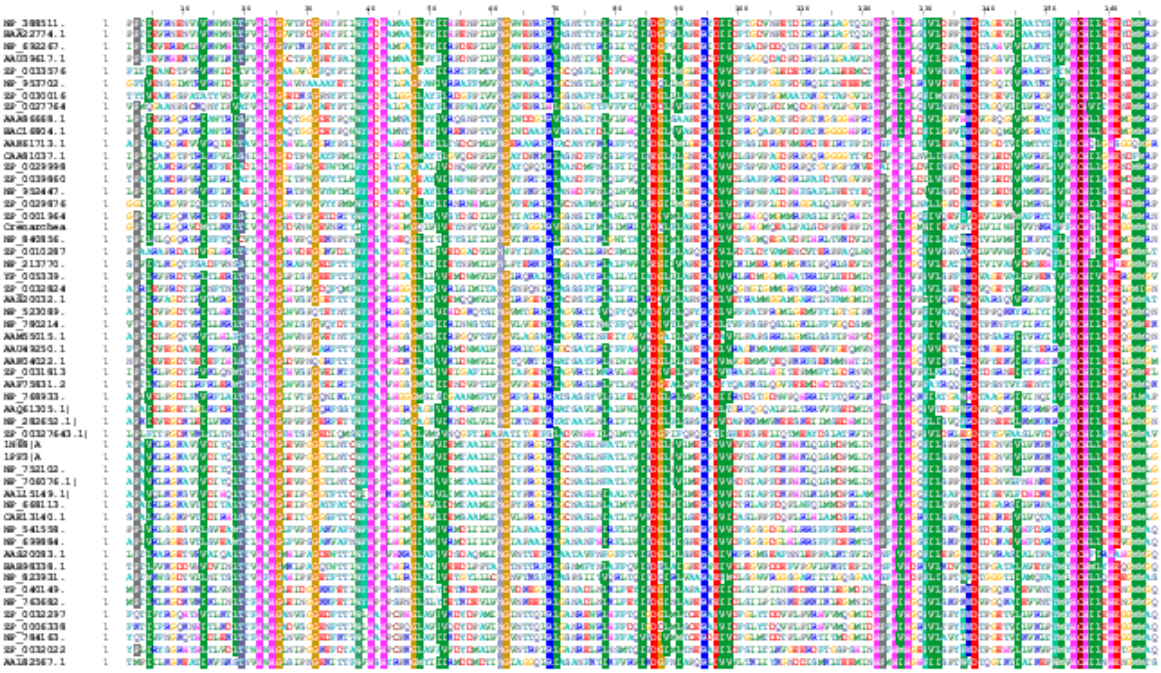


Fig. 3. Diagrama de máxima verosimilitud generado con Bioedit y editado con MEGA. Que muestra únicamente las secuencias Parálogas en *Pseudomonas*. Una rama agrupa secuencias con función oxidasas multicobre y la otra de proteínas de resistencia a cobre y ambos grupos con distancia significativa, que indica enzimas con secuencias y funciones diferentes en la misma especie.

Firmas por grupos. Se alineó por separado las secuencias que en alineamiento general y en árbol se agrupan por poseer mayor similaridad, se obtuvieron las posibles firmas por grupos. Primero mostramos la similitud entre los dos grandes conjuntos de secuencias de dos grandes ramas del árbol general. Que hemos llamado grupo A 54 y grupo B. Mostrando solo las columnas informativas para el conjunto de secuencias. La comparación de estas figuras muestra regiones conservadas diferentes para cada grupo las figuras 3 y 4 muestran columnas conservadas por grupos.

Grupo A sin espacios (gaps)



Grupo B sin espacios

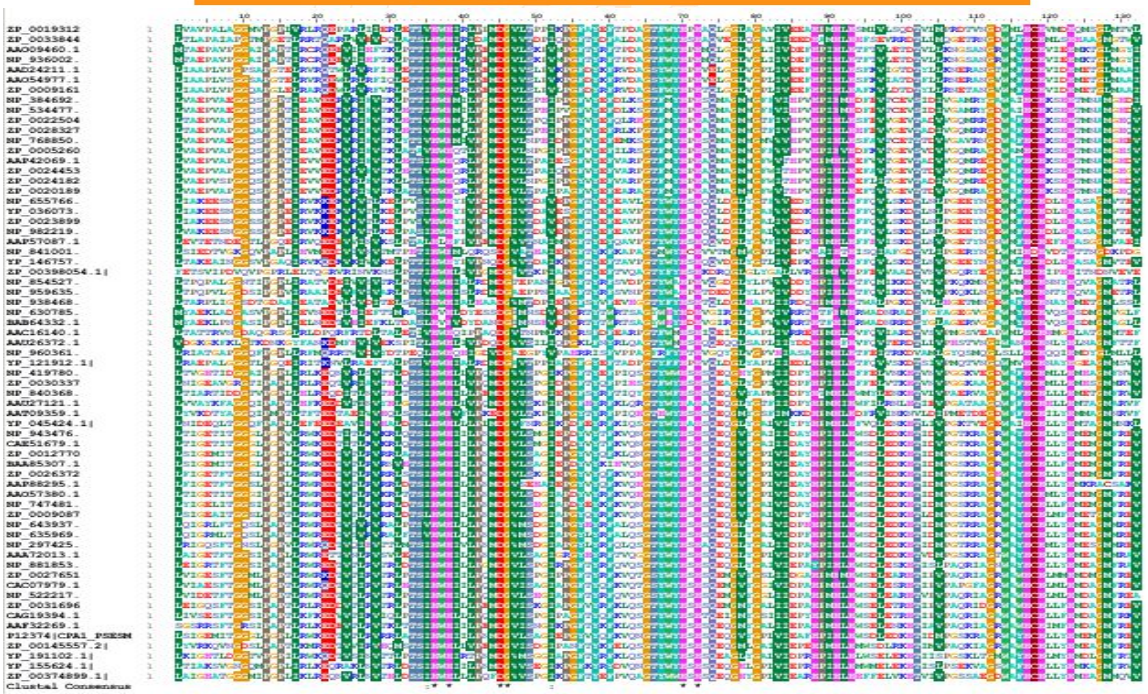


Figura 4. Las dos grandes ramas del árbol de 103 secuencias, grupo A con 54 y grupo B con 65 secuencias sin espacios

Con estos resultados, podemos inferir en relación con la actividad de las oxidasas caracterizadas que la semejanza entre secuencias de cada rama, forma un grupo compacto para cada reino de organismos y dentro de las bacterianas las separa por actividad diferente reportada por los autores como el caso de las secuencias de *B. cereus* y otras oxidasas multicobre, como las de *B. weihenstephanensis, Geobacillus kausttophillus* y *Geobacillus thermodenitrificans,* cercano a la rama de *B. halodurans*, que es la única oxidasa caracterizada bioquímicamente por Ruijssenaars [36].

En otra rama, se identificó otro grupo de oxidasas que comprende a B. *subtilis, B. licheniforme B. clausii, Bacillus amyloliquefascien, Bacillus pumilus, Bacillus coagulans* y *Oceanobacillus iheyensis* que son otro grupo de actividad diferenciada, con mayor cercanía de actividad de lacasa. La actividad de CotA es más cercana a la rama hermana formada por Thermus, Chloroflexus, aquifex y la archea pyrobaculum y en otro nivel en la misma rama con CueO, PPO y EpoA que al otro grupo *Bacillus*. En cambio *B. thuringiensis* probablemente más similar a la llamada lacasa alcalina de *B. halodurans,* mientras que *B. thuringiensis* presenta menor semejanza a todas las oxidasas bacterianas, lo cual coincide con lo reportado por [13,24,26]. Se pudo observar también que algunas especies presentaron en su genoma más de una secuencia de la enzima de este tipo (proteínas parálogas) indicando diferentes funciones en el mismo organismo; éstas presentan una enzima de resistencia a cobre y otra del grupo similar a lacasas, éstas secuencias, por separado, presentaron mayor similitud con secuencias de otras especies (proteínas ortólogas) que muestran actividad o función similar, a diferencia de las parálogas encontradas. Estas observaciones no han sido reportadas por otros autores previamente, solo para el caso de hongos como isoenzimas reportadas por [13]

Comparación de diagramas de relación de la colección

El árbol obtenido con la colección completa de secuencias bacterianas se consideró como un árbol de familia de oxidasas multicobre bacteriana, y se agrupó de forma consistente utilizando diferentes criterios de construcción: Distancias, máxima verosimilitud (Mínima evolución, Neiborg joining, Maximun likelihood), en todas mostró una topología similar en sus diferentes ramas a la selección presentada en las fig. 1. Esta forma de agrupamiento permitió inferir que las diferentes ramas abarcaban las funciones distintas para las oxidasas multicobre, y que éstas se han diversificado más en comparación con las oxidasas multicobre fúngicas [13] en las cuales mantenían función similar, en niveles de identidad cercanas al 20%. Se pudo observar también que algunas especies presentaron en su genoma más de una enzima de este tipo (proteínas parálogas) indicando diferentes funciones en el mismo organismo; éstas presentan una enzima de resistencia a cobre y otra del grupo similar a lacasas, éstas secuencias, por separado, presentaron mayor similitud con secuencias de otras especies (proteínas ortólogas) que muestran actividad o función similar, a diferencia de las parálogas encontradas. Estas observaciones no han sido reportadas por otros autores previamente, solo para el caso de hongos como isoenzimas reportadas por Valderrama *et al*., 2003.

El análisis más detallado por ramas o grupos nos permitió predecir que existe una alta conservación de motivos de los sitios en todos los grupos, pero no así en actividad enzimática de probables oxidasas multicobre. Las diferencias entre estas especies probablemente se deban a que utilicen sustratos y/o nichos ecológicos distintos.

Con la colección de secuencias y selecciones de homologas cercanas y lejanas, que se realizaron con las secuencias parálogas, se observada de manera consistente la separación en al menos tres grupos o ramas las más cercanas a las típicas MCO, las cercanas a funciones de resistencia a cobre, y un tercer grupo con funciones diferentes consensos donde se encuentra la llamada lacasa alcalina.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una colección depurada de proteínas pertenecientes a eubacterias y a archeas que cumplen con los requisitos estructurales derivados de las oxidasas de cobre fúngicas.
- Se obtuvieron elementos críticos a partir de las secuencias proteicas para diferenciar por grupos e identificar secuencias ortólogas y parálogas.
- Se puede afirmar con alta probabilidad de certeza que las secuencias homologas obtenidas tendrán actividad de oxidasa de cobre, aunque con diferente especificidad en función de su agrupación filogenética.
- Se encontraron varias copias de oxidasas en el mismo organismo, probablemente con diferente función, que indica los mecanismos de duplicación en paralogía, utilizados para adaptación a diversos hábitat y funciones nuevas desarrolladas para la evolución.
- Es importante verificar a futuro actividad de las oxidasas que probablemente pudieran mostrar actividad novedosa con la finalidad de aplicarlas a mejorar el tratamiento de alguno de los desechos tóxicos de las agroindustrias del tequila, curtido de piel y cuero, o del Papel, según su actividad

REFERENCIAS

[1] Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M. 2000. Docolorization and detoxificacion of textiles dyes with a laccase from Trametes hirsuta. Applied and environmental Microbiology. 66(8): 3357-3362

[2] Mayer M., A and R. C. Staples. 2002. Laccase: new function for an old enzyme. Phytochemistry 60: 551-565

[3] Gottfried Kandioller and Lew Christov. 2002. Catalyst potential of laccase-mediator systems and transition metal polyoxometalates in oxygen bleaching of pulp. Internacional convention center, Durban October 2002.

[4] Karam , J & J.A. Nicell. 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. J. Chem. Tech. Biotecnol. 69: 141-153

[5] Leonowicz A., Nam-Seok, J. Luterek, A. Wilkolazka, M.Woitas-Waasilewska, A. Matuszewka, M. Hofrichter, D. Wesenberg and J. Rogsalsky. 2001. Fungal Laccase: Properties and activity on lignin. J. Basic Microbiol. 41 (3-4) 185-227

[6] Bollag J. M. 1992. Decontaminating soil with enzymes. Environmental Science and technology. 26:1876-1881.

[7] Bollag, J. M., Shuttleworth, K.L. and D.H. Anderson. 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. Applied Enviromental Micribiology. 54: 3086-91

[8] Gianfreda L, F.Xu, and J.M. Bollag. 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal. 3(1):1-25

[9] Solomon I., E., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin. 1996. Multicopper oxidases and oxigenases. Chemical Reviews 96: 2563-2605

[10] Alexandre, G. and Zhulin, I.B. 2000. Laccases are widespread in bacteria. Trends Biotechnol. 18(2): p. 41-2.

[11] Hoegger, P.J., S. Kilaru, T.Y. James, J.R. Thacker and U. Kües. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. FEBS Journal 273:2308-2326

[12] Brena-Becerril Alejandro, Brenda Valderrama-Blanco, Ma. Cristina del Rincón-Castro and Juan F. Gómez-Leyva. 2012. Optimization of the Clustal X program for the alignment of multicopper oxidase bacterial sequences and their presence in the *Bacillus* genus. African Journal of Biotechnology Vol. 11(101), pp. 16640-16649, 18 December, 2012. Available online at http://www.academicjournals.org/AJB

[13] Valderrama, B. B., P. Oliver, A. Medrano-Soto, and R. Vázquez-Duhalt. 2003. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. Antonie van Leeuwenhoek. 84: 289-299

[14] Thurston, F. C. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140:19-26

[15] Yaropolov, A. I., Skorobogat Ko, O. V., and Vartanov, S. D. 1994. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology. 49: p. 257-280.

[16] Xu, F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry. 35: p. 7608-7614.

[17] Xu, F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. J Biol Chem. 272: p. 924-928.

[18] Hernández-Torres J., Jhon A. Rodriguez-Buitrago. J. Chomilier. 2006. Hydrophobic cluster análisis (HCA) revela la existencia de isoformas de baja identidad de lacasas (EC 1.10.3.2) en 7 phyla de bacteria. Actual Biol. 28 (85):101-114

[19] Thompson, J. D., D. G. Higgins., and T.J.Gibson, 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. Nucleic Acids Research. 22:4673-4680

[20] Thompson, J .D., T. J.Gibson, F. Plewniak, F.Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. Nucleic Acids Research. 25:4876-4882.

[21] Robert C. E. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, Nucleic Acids Research 32(5), 1792-97

[22] Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis.

[23] Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in bioinformatics 5:150-163.

[24] Jiménez-Juárez, N, R. Román-Miranda, A. Baeza, R. Vázquez-Duhalt and B. Valderrama1 2005. Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea* Journal of Biotechnology. 117:73-82.

[25] Solano F., P. Lucas-Elio, E. Fernández, and A.Sanchez-Amat. 2000. *Marinomonas mediterranea* MMB-1 transposon mutagenesis: isolation of multipotente polyphenol oxidase mutant. J. of Bacteriology. 182(13) 3754-3760.

[26] Enguita, J. F., D. Marçal. L.O.Martins, R. Grenha, A. O. Henriques, PF. Lindley, and M. A. Carrondo. 2004. Substrate and dioxide binding to the endosperm Cota laccase from *Bacillus subtilis*. Journal of Biological Chemistry 279(22): 23472-23476.

[28] Roberts, S. A., Weischel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C., and Montfort, W.R. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 2766-2771.

[29] Roberts, S. A., G.F. Wildner, Grass, G., A. Weichsel, A. Ambrus, C. Rensing, and W.R. Montfort. 2003 A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. The J. of Biol. Chem. 278(34):31958-31963.

[30] Endo, K. Y. Hayashi, T. Hibi, K. Hosono, T. Beppu and K. Ueda. 2003 Enzymological Characterization of EpoA, a Laccase-Like Phenol Oxidase Produced by *Streptomyces griseus.* J. Biochem, 133(5): 671-677

[33] Eddy, S. R. 2004. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? Nature Biotechnology 22(8): 1035-1036

[34] Dayhoff M O, R M Schwartz y B C Orcutt. 1978. A Model of Evolutionary Change in Proteins, in Atlas of Protein Sequence and Structure 5: p. 345-352

[35] Henikokk, S. and J. Henikoff 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry 89: 10915-10919.

[36] Ruijssenaars, H. J., and S. Hartmans. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. Appl. Microbiol Biotechnol. 65:177-182.

RELACIONES FILOGENÉTICAS DE MICROORGANISMOS Y PLANTAS DENTRO DEL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA Y COBALAMINA MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. (PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF MICROORGANISMS AND PLANTS WITHIN THE METABOLISM OF HOMOCYSTEIN AND COBALAMINE THROUGH BIOINFORMATIC ANALYSIS).

[1]Valle-Hernández, Silvia., y [1,2*]Brena-Becerril, Alejandro.

1. Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 # 595 carretera Tlajomulco Santa Fe, Lomas de Tejeda. Tlajomulco de Zúñiga Jal. México.
2. Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Jalisco. Km 3.2 Carretera Las Cuatas a San Isidro. Santa Cruz de las Flores, Tlajomulco de Zúñiga, Jal. México

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com, abrena.cecytej@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La vitamina B_{12} contiene un ion metálico, el cobalto, que pertenece al grupo de los oligoelementos, además es coenzima de las *cobalaminas*. El termino cobalamina está vinculado a una familia de compuestos, en la que se encuentra la vitamina B6. El objetivo de este trabajo es relacionar la molécula de cobalamina con secuencias homologas de otros microorganismos y plantas precursores de este compuesto, con ayuda de programas bioinformáticos del NCBI y otros, usando como sonda: homocisteína metiltranferasa de *Bacillus anthracis* con n° de acceso ANR59698.1, con la que se obtuvo una colección de secuencias de microorganismos, y otra usando como otra sonda *Arabidopsis thaliana* con n° de acceso OAO94672.1 para el fichero de plantas, el programa ClustalW2 y Bioedit permitió hacer los alineamientos correspondientes El análisis bioinformático se desarrolló en el laboratorio de computo de la Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara de Mayo a Julio del 2017. Desde un punto de vista médico y biotecnológico es de gran interés esta proteína porque su disminución en el cuerpo humano, en diferentes rangos de edades, afecta de manera considerable provocando el desarrollo de enfermedades neurológicas y cardiovasculares, por lo que conocer homólogos productores, permitirá inferir de una manera más profunda sus funciones previamente mencionadas.

Palabras clave: Homocisteína; Cobalamina; Relaciones filoproteicas; Enfermedades neurológicas.

ABSTRACT

Vitamin B12 contains a metal ion, cobalt. Cobalt belongs to the group of trace elements, it is coenzyme cobalamines. The term cobalamin is linked to a family of compounds in which vitamin B6 is found. The objective of this work is to relate the molecule cobalamin with sequences Homologues of other microorganisms and precursor plants of this compound, with the aid of bioinformatic programs such as NCBI, using as probe*:* homocysteine methyltranferase *Bacillus anthracis* whith Access number *ANR59698.1,* a collection of microorganisms was obtained, and with the probe *Arabidopsis thaliana* whith acess number *OAO94672.1* ClustalW2 and Bioedit program allowed to make the corresponding alignments The bioinformatic analysis is developed in the computer laboratory of the Polytechnic

University of the Metropolitan Area of Guadalajara from May to July of 2017. From a biotechnological point of view it is of great interest this Protein because its decrease in the human body affects And considerable way in different age ranges causing the development of neurological and cardiovascular diseases, so that knowing homologous producers through bioinformatic analysis will allow to infer in a more profound way its previously mentioned functions

Keywords: Homocysteine; cobalamin; Filoprotetic relations; neurológical diseases.

INTRODUCCIÓN

La vitamina B_{12} cuenta con la estructura química más grande y compleja de todas las vitaminas es única entre las vitaminas debido a que contiene un ion metálico, [8] el cobalto.

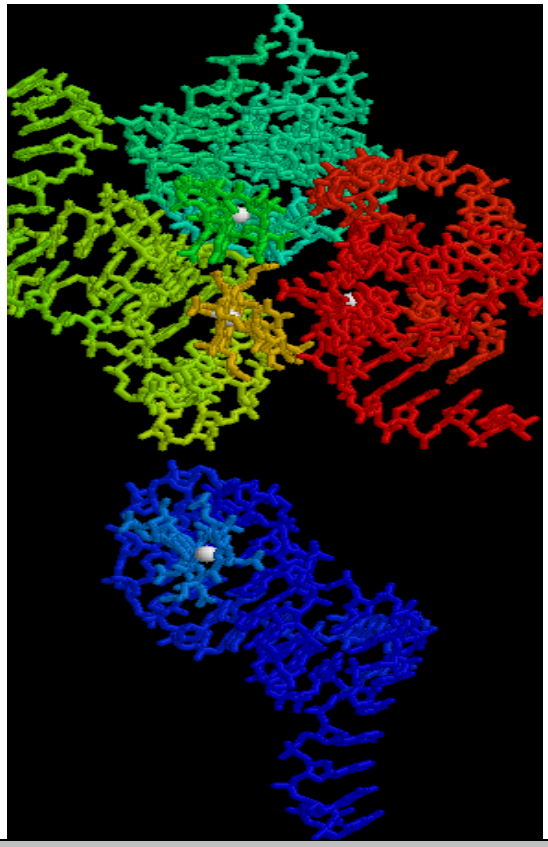


Fig1: Estructura de la cobalamina por cristalografía en rayos x, visualizada y rediseñada con el programa rasmol (en color blanco se señala el cobalto) con el código 1ddy para PDB.

El cobalto pertenece a la familia de los oligoelementos y a su vez se clasifica en ultra oligoelementos, cumple funciones de cofactor en enzimas como peptidasas y ribonucleótido peptidasas (síntesis de ADN) [9]. Se almacena en el hígado (80%); el metabolismo la va utilizando a medida que el organismo lo necesita, las cantidades que se almacenan pueden satisfacer nuestras necesidades por un periodo de 3 a 5 años [10], además mantiene una estrecha interrelación metabólica en la metilación de la Homocisteína, la relevancia biológica de esta vitamina radica en la deficiencia de esta debido a que

desencadena enfermedades como la anemia megaloblástica, medula espinal y trastornos de nervios periféricos como la esclerosis múltiple (EM) la cual se define como una enfermedad progresiva que cursa con la aparición de lesiones inflamatorias focales (placas) en la sustancia blanca cerebral la cual se encuentra situada en el sistema nervioso periférico (SNP) el cual está constituido por astrocitos, oligodendrocitos y células de Shwamn, los dos primeros corresponden al sistema nervioso central y su función principal es aportar soporte a los axones y producir la vaina de mielina que simula el aislamiento entre los axones[14], la mielina actúa como conductor de impulsos eléctricos, es decir su propósito es permitir la trasmisión rápida y eficiente de los impulsos a lo largo de las neuronas lo más llamativo es la pérdida de mielina (desmielinización), con preservación relativa de los axones en la fase precoz, aunque puede estar muy afectada en las fases finales. Por tanto, el propósito primordial de la vitamina B12 (cobalamina) es la participación en el mantenimiento de la vaina de la mielina de las células nerviosas y en la síntesis de neurotransmisores, además de intervenir en la síntesis de DNA, RNA, proteínas y formación de glóbulos rojo. [12] El proceso a nivel metabólico dentro del cuerpo humano se desencadena posterior a la deglución la vitamina B12 es separada del alimento que la contiene, con ayuda de la pepsina liberada en la cámara gástrica. Una vez liberada en el estómago se une a las proteínas ligadoras R'' o cobalofilina-vitamina B12, se descompone con ayuda de las proteasas pancreáticas. Las interrelaciones de los árboles [13] ayudan a predecir cuáles secuencias tendrán una función equivalente.

MATERIALES Y MÉTODOS

La colección de secuencias homologas perteneciente a organismos eucariontes y procariontes fue generada a partir de la base de datos del National Center for Biotecnología Información NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando las secuencia, de homocisteina metiltranferasa perteneciente a *Bacillus anthracis (*ANR59698.1) para bacterias y para plantas, se utilizó *Arabidopsis thaliana* (*OAO94672*.) además se incluyeron microorganismos capaces de producir proteínas recombinantes de interés biotecnológico farmacéutico, para ello se utilizó la secuencia *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001696420.1) La búsqueda se realizó mediante BLASTP (Protein Basic Local Alignment Search Tool), PSI-BLAST (Position-SpecificIterated BLAST) Los criterios empleados para la distinción de las secuencias fueron el porcentaje de identidad y el query Cove. Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo mediante ClustalX y Clustal omega. En ClustalX se generó el alineamiento múltiple, perfeccionando los alineamientos mediante BioEdit. Se probaron los árboles generados por el método de máxima verosimilitud y mínima evolución por el programa MEGA 4.0 Finalmente se eligió el árbol obtenido por método del cálculo del árbol linealizado. Cada secuencia se alineó con la colección ya dada mediante ClustalX y los alineamientos resultantes fueron depurados por BioEdit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un grupo de 81 secuencias de las cuales 53 son plantas, algunas de ellas son: árbol de granada (*Púnica granatum*), planta fanerógama (*Macleaya cordata),* plantas carnívoras *(Genlisea aurea),* asteráceas *(Cynara cardunculusar. Scolymus.)* 10 secuencias pertenecen a microalgas capaces de producir proteínas de interés, en este caso la selección se efectuó con el criterio de posibles proteínas terapéuticas capaces de prevenir y remediar las enfermedades previamente mencionadas, para ello se empleó *Chlamydomonas reinhardtii (*XP_001696420.1) de la cual solo se seleccionaron 9 secuencias homologas las cuales contaban con un porcentaje de identidad que oscila entre el 90 y 68%. Por otra parte 18 secuencias proteicas pertenecientes a bacterias se clasificaron en 3 grandes grupos: *Bacillus* (*B.cereus, B. thuringiensis),* Streptococcus *(S. equinus)* y *Paenibacillus (P. graninis).*

Los resultados obtenidos mediante la búsqueda fueron verificados realizando un re muestreó inverso mediante las mismas sondas utilizadas con los algoritmos BLASTP, PSI-BLAST, y DELTA-BLAST, confirmando la consistencia de la selección.

El árbol filo proteico (dendograma) obtenido, agrupa las secuencias en tres clados principales, en el primero se encuentran los microorganismos productores de la cobalamina, los cuales se agrupan en 3 grandes grupos: *Bacillus, Streptococcus y Paenibacillus*.

El segundo clado contiene las microalgas verdes las cuales han demostrado ser capaces de sintetizar proteínas recombinantes funcionando de esta manera como reactores biológicos. Son capaces de producir proteínas recombinantes de gran interés biotecnológico, además de ser inocuas para el ser humano, se conoce hasta el momento que algunas micro algas pueden ser manipuladas genéticamente, sin embargo solamente la *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido la única capaz de ser manipulada genómicamente, es por ello que esta microalga captó la atención y nos ínsito a investigar sus homólogos, a mediano plazo se pretende utilizar alguno de los 10 posibles biorreactores que aparecen en el clado de color amarillo para de esta manera obtener cobalamina de una procedencia diferente a la usual. Para demostrar la consistencia de esta información se usó también el EMBL el cual es un centro de información biotecnológica de Reino Unido, con ayuda de la herramienta CLUSTAL OMEGA para alineamientos de diversas secuencias proteicas, con el código 120170916-0150-97766237-es, se obtuvo la tabla1 en la cual se aprecia la matriz de porcentaje de identidad.

En el clado 3 se encuentran las plantas que contienen cobalamina y el segundo grupo agrupa a los microorganismos productores de cobalamina. Analizando al primer gran grupo podemos inferir los siguientes aspectos: a simple vista se puede observar la relación directa que existe entre la separación de los taxones *Púnica granatum* (granada rosa) y *Eucalyptus grandis* (eucalipto rosado) pertenecen a la división de las magnoliophyta (plantas productoras de semillas), al igual que las *Gossypium hirsutum y G. arboreum*, que se encargan de la producción del algodón ambas pertenecientes a la familia malvácea. *Teobroma caco* (árbol de cacao) pertenece a la familia de las malváceas, *Citrus clementina* es el resultado de la hibridación entre la mandarina y la naranja amarga pertenece a la división magnoliohytas, por otro lado *Hevea brasiliensis* (árbol de caucho) y *Manihot esculenta* (yuca) pertenecen a la familia de las Euphorbeacea y *Ricinus communis* (higuerilla) dentro de la misma división con la familia de las rosáceas se encuentran*: Prunus avium* (cerezo silvestre), *Prunus pérsica* (durazno) y *Malus domestica* (manzano); dentro de la familia de las caricaceaeas se encuentra la *Carica papaya* (papaya), en la familia papaveraceae se encuentra *Macleaya cordata*, en la familia nelumbonaceae se encuentra *Nelumbo nucifera* (flor de loto). dentro de las familias solanácea, apiaceae, orobancácea y amarantácea se encuentran; *Solanum tuberosum* (patata), *Daucus carota* (zanahoria), *Phelipanche ramosa y Chenopodium quinoa* (quinoa).

```
#  Percent Identity  Matrix - created by Clustal2.1
#
#
```

1: Klebsormidium	100.00	68.93	68.34	67.13	68.00	68.48	62.57	61.24	62.52	60.89	
2: 1Ostreococcus	68.93	100.00	92.18	71.04	71.38	70.73	61.17	59.49	60.60	60.07	
3: 2Ostreococcus	68.34	92.18	100.00	69.87	69.94	70.13	59.74	59.62	60.07	59.07	
4: Parachlorella	67.13	71.04	69.87	100.00	78.20	77.20	60.97	58.97	60.56	58.98	
5: Chlamydomonas	68.00	71.38	69.94	78.20	100.00	88.38	59.05	59.84	60.53	59.47	
6: Volvox	68.48	70.73	70.13	77.20	88.38	100.00	58.74	60.43	60.95	59.49	
7: Lobosporangium	62.57	61.17	59.74	60.97	59.05	58.74	100.00	60.60	60.71	61.43	
8: 1Dictyostelium	61.24	59.49	59.62	58.97	59.84	60.43	60.60	100.00	79.15	80.10	
9: Polysphondylium	62.52	60.60	60.07	60.56	60.53	60.95	60.71	79.15	100.00	82.94	
10: 2Dictyostelium	60.89	60.07	59.07	58.98	59.47	59.49	61.43	80.10	82.94	100.00	
11: 3Dictyostelium	61.43	60.10	59.25	59.98	58.97	59.23	62.10	80.63	82.96	88.95	

TABLA 1: matriz de porcentajes de identidad, creada con la herramienta CLUSTAL OMEGA en EMBL con el código :1270917-055211-0304-98295932-pg-pim.

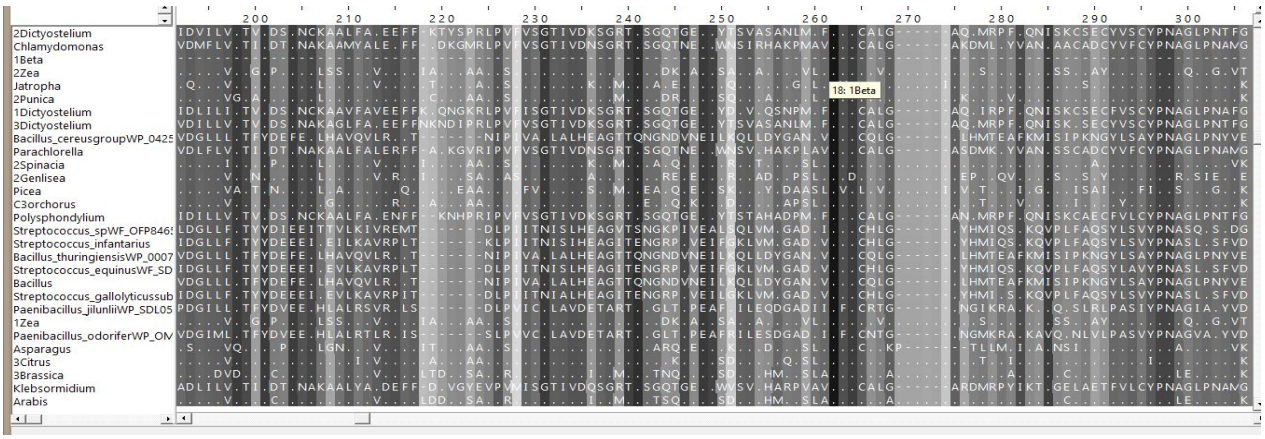


Figura 2: fragmento del alineamiento de las secuencias homologas de microorganismos, plantas y microalgas que pruducen cobalamina, diseñado en CLUSTALX 2.81 y perfeccionado en BIOEDIT, en color negro se muestra 100 % de identidad en color gris oscuro 90% y en gris claro 70%.

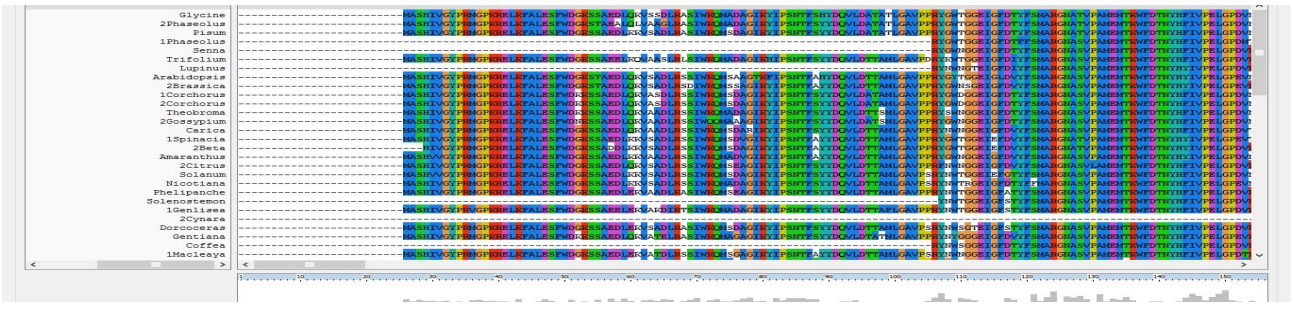


Figura 3: alineamiento de las secuencias homologas de microorganismos, plantas y microalgas que producen cobalamina en Clustal X 2.81.

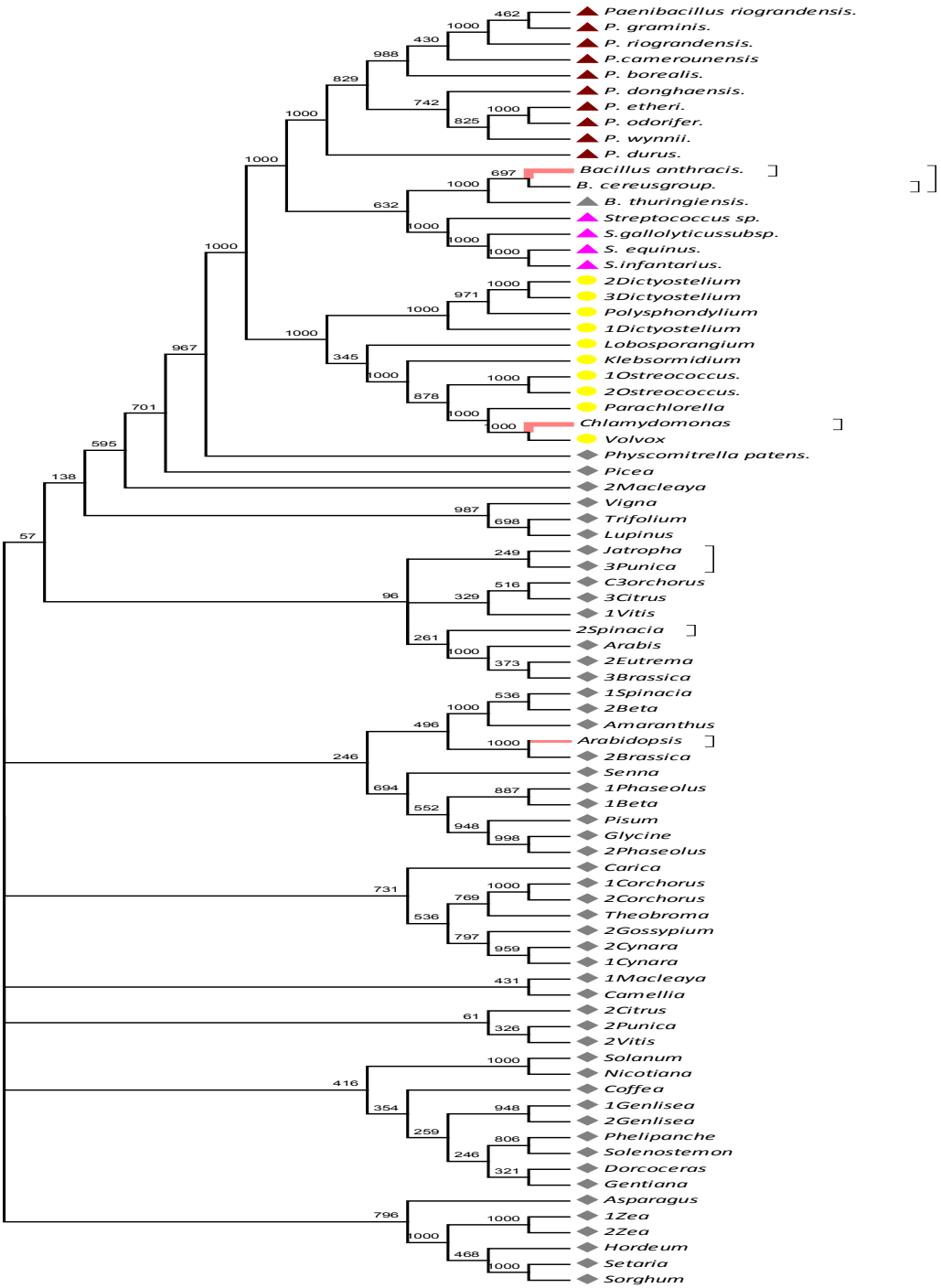


Figura 4. Árbol filoprotéico obtenido por el método de vecinos cercanos, es por ello que no se aprecia algún ancestro común, fue realizo con el programa CLUSTAL X y visualizado y perfeccionado en MEGA 4.

CONCLUSIONES

El árbol filoprotéico generado manifiesta la posibilidad de la existencia de la vitamina B12 en frutos y no solo en productos de origen animal como muchos autores afirman. Los ejes futuros para profundizar aún más en este tema será necesario el análisis bioquímico de esta vitamina para corroborar la existencia en dichas plantas previamente mencionadas y de esa manera afinar aún más el conocimiento biológico de dicha vitamina, por otro lado con la nueva adquisición de conocimiento sobre los biorreactores y las microalgas, consideramos que este tema tiene mucho potencial biotecnológico, aunque claro, la presencia o inexistencia de esta vitamina en las plantas afecta de manera directa al sistema cardiovascular y neurológico del ser humano, es por ello que el conocer una variedad de posibles productoras de esta vitamina generara un control a nivel metabólico en el ser humano.

REFERENCIAS

[1] Clarke R, Collins R.1998. Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease. J Cardiovasc Risk 1998; 5:249-255. (Julio-2017)

[2] de Bree A, Verschuren WMM, BjorkeMonsen A-L, van der Put NMJ, Heil SG, Trijbels FJM, Blom HJ. 2003. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C_T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. Am J Clin Nutr 2003; 77:687-693. (julio-2017)

[3] Mariela F, Irma G, Hortencia G. 1999. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. Instituto de Hematología e inmunología. Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1999;15(3):159-74.p.p 160-172

[4] J.L Carrentero Ares,W.Bowakin,J.M Acebes Rey 2011. Actualización: esclerosis múltiple. Hospital universitario del rio Hortega Valladolid. Median 2001; 11:516-529

[5] Submitted (17-SEP-2015) Chemistry, University of Illinois at Urbana Champaign, 1206 W. Gregory Dr. MC-195, Urbana, IL 61801, USA Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can found here: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

[6] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). "Basic Local Alignment 11 Search Tool", J. Mol. Biol.(215), 403-410.

[7] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). "The ClustalX 17 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis 18 tools", Nucleic Acids Research (25), 4876-4882.

[8] Centro de información de micronutrientes, (2017,10, Julio) Vitamina B12, Oregon state universisty.Available:http://lpi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/vitamina-B12#funcion

[9] Fagro (2017,10, julio) nutrición vegetal, disponible en:http://www.fagro.mx/nutricion-vegetal.html

[10] Sonadita, (2017,11, julio) Vitamina B12-cobalamina disponible en: Http://www.zonadiet.com/nutricion/vit-b12.htm

[11] Emilio Rose, Xavier Pinto, (2003, mayo), Homocisteína, ácido fólico y enfermedad cardiovascular. Instituto flora.

[12] Gisela Pita R. (1998) Acido fólico y vitamina B12 en la nutrición humana. Instituto de nutrición e higiene de los alimentos.

[13] Leandro J., Metabolismo del ácido fólico y vitamina B12.Fisiologia humana de la U.B.A

[14] J.L Carreto Ares,W.Bowakim DIB(2017,17,julio)Actualización: esclerosis múltiple, Hospital universitario del rio Hortega,Valladolid.11(9) PP. 519-527.

[15] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). "The ClustalX18 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis19 tools", Nucleic Acids Research(25), 4876-4882.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GENOMA COMPLETO DE UNA CEPA SENSIBLE DE *Mycobacterium tuberculosis* DEL ESTADO DE JALISCO.

[1]Padilla-Martínez, L.F., [2]Lara-Lozano, M., [3]Islas-Rodríguez, A., [1]Gutierrez-Garcia, G.J., [2]González-Barrios, J.A., y [1*]Álvarez-Maya, I.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco, México. 44270.
2. Laboratorio de Medicina Genómica. Hospital Regional 1o. de Octubre, ISSSTE, Ciudad de México, México. 07760.
3. Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México. 45220.

*Autor para correspondencia: Ikuri.alvarez@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis es la bacteria responsable de la tuberculosis, y es conocida por su alta tasa de resistencia a los medicamentos. Se han reportado genes relacionados a fármaco resistencia, sin embargo siguen emergiendo cepas resistentes debido a una inadecuada prescripción de antibióticos y mala adherencia del paciente a la terapia, dando como resultado nuevas mutaciones que hacen el diagnóstico más complejo. Se han encontrado cepas sensibles a fármacos de primera línea que fueron recurrentes, por lo que secuenciar el genoma completo de estas es indispensable para determinar las mutaciones responsables. El genoma de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* sensible recurrente fue obtenida del laboratorio de salud pública del estado de Jalisco. Se purificó la muestra y se construyó la librería genómica del DNA para la realización de la secuenciación de nueva generación en la plataforma MiSeq de Illumina. Las lecturas fueron ensambladas de *novo* en contigs para su posterior alineamiento con el genoma de referencia H37Rv y así observar las mutaciones existentes. Las posibles mutaciones observadas, se encuentran en los genes: *PPE7, Rv0600c, mshD, echa6, irtB, nadB, Rv2206, recO, Rv2792c* y *mutY.* No hubo ninguna coincidencia al comparar éstas mutaciones con la base de datos TBDReaMDB.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; Secuenciación; Biotecnología Médica; Bioinformática; Diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad pulmonar contagiosa que se transmite cuando las personas enfermas de tuberculosis lanzan al aire microorganismos, conocidos como bacilos de la tuberculosis. Un tercio de la población mundial está actualmente infectada de tuberculosis, de los cuales entre el 5% y 10% desarrollan la forma activa de la enfermedad [OMS 2013]. La aparición de la tuberculosis resistente a los medicamentos es una gran amenaza para el control de la enfermedad. El incremento de las mutaciones asociadas a resistencia que no son detectadas cuando se está bajo un tratamiento de antibióticos, aumenta el riesgo de transmitir una cepa resistente, que está asociado con el fracaso en la

terapia. Se han reportados varios genes relacionados a drogo resistencia, sin embargo, siguen emergiendo cepas fármaco resistentes debido a monoterapias no intencionales que resultan de una inadecuada prescripción de antibióticos que no se ajustan a los protocolos recomendados, pobre adherencia del paciente a la terapia, fallas en la supervisión del tratamiento, limitado suministro de drogas, bajo estándar en la calidad de las drogas antituberculosas y en general, fallas en las políticas nacionales para apoyar los programas de control de tuberculosis, dando como resultado nuevas mutaciones que hacen el diagnostico de tuberculosis más complejo. *Mycobacterium tuberculosis* es responsable de aproximadamente 8.6 millones de nuevos casos de infección de tuberculosis activa, y millones de muertes anualmente a pesar de que existan medicamentos para combatirla. La aparición de cepas de tuberculosis resistente a los medicamentos es un problema de salud pública a nivel mundial [1,2,3].

Determinar la opción de tratamiento más eficiente a través de pruebas genotípicas para encontrar las mutaciones asociadas a resistencia se ha convertido en una práctica común en la rutina en manejo de enfermedades causadas por un agente infeccioso. La secuenciación genómica dirigida es la técnica más exacta y está considerada como el estándar molecular para definir genotípicamente a una cepa fármaco resistente. Permite la ubicación concreta de la(s) mutación(es) y consiste en identificar y analizar la secuencia nucleotídica de un ADN específico. Para el caso del diagnóstico de resistencia a fármacos en micobacterias, es posible secuenciar el genoma, e identificar la mutación o mutaciones específicas mediante comparación con el gen de una cepa sensible.

La investigación dentro del área biológica se enfrenta a mayores retos que implican el manejo de enormes volúmenes de datos que crecen de manera exponencial en tamaño y complejidad, debido a los avances tecnológicos que permiten hacer cálculos más precisos. Afortunadamente, el desarrollo ha permitido un avance significativo en las técnicas para el procesamiento y análisis inteligente de los datos, beneficiando los estudios científicos que permiten conocer mejor las estructuras de los organismos vivos. Las tareas más importantes de las que se ocupa la bioinformática consisten en entender las correlaciones, las estructuras y los patrones en los datos biológicos. Esto implica el uso de tecnologías informáticas y métodos estadísticos para manejar y analizar un gran volumen de datos biológicos sobre el ADN, el ARN y las secuencias de proteínas. La secuenciación genómica junto con la tecnología informática sofisticada permitirá la detección de forma rápida de posibles mutaciones dañinas del genoma, convirtiéndose en protagonista para participar en el diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz de enfermedades.

En un estudio anterior se analizaron secuencias de cepas de *M. tuberculosis* que fueron proporcionadas por el laboratorio estatal de salud pública del estado de Jalisco. Algunas de ellas presentaban variaciones en su patrón de resistencia fenotípica, entre las cuales destacaba una cepa sensible a los fármacos de primera línea, sin embargo presentaba recurrencia. El análisis molecular mediante la técnica de secuenciación masiva evidenciará las mutaciones propias de la cepa que permitirá explicar la fármaco-resistencia observada en el campo clínico. Para lograr esto se tuvo que integrar un banco de ADN genómico de las cepas de *M. tuberculosis* y purificar el ADN para la construcción de bibliotecas genómicas, realizar una secuenciación de nueva generación del genoma completo de cepas de *M. tuberculosis* circulantes en el estado de Jalisco, ensamblar el genoma de las cepas secuenciadas y realizar el alineamiento de estas secuencias con el genoma de referencia, para identificar mutaciones

presentes en una cepa sensible recurrente de *M. tuberculosis* y estudiarlas para su posible relación con fármaco-resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cepa

La cepa de *M. tuberculosis* estudiada fue obtenida del Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Jalisco, México. La información demográfica del paciente se obtuvo de los registros de laboratorio clínico. El laboratorio proporcionó el ADN genómico aislado de la cepa, con la información de la prueba de susceptibilidad al fármaco.

Purificación y cuantificación del ADN genómico

Se llevó a cabo la purificación de la muestra para obtener mejores resultados de la secuenciación. Se realizó una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%, en donde el ADN genómico se corrió. Se recortó el gel de agarosa donde se observó la banda de ADN genómico, la purificación se llevó a cabo utilizando el kit de columnas QIAquick de QIAGEN. La cuantificación del ADN purificado fue realizada utilizando el NanoDrop 2000 de Thermo Scientific's para asegurar que la concentración obtenida de la muestra, fuera la suficiente para la concentración de entrada al realizar la secuenciación, y para verificar que la purificación había sido correctamente ejecutada sin contaminar la muestra.

Librería genómica y Secuenciación de nueva generación

La librería fue construida a partir del ADN genómico purificado, utilizando el kit de preparación de librerías Nextera XT de Illumina, siguiendo el protocolo del fabricante. La librería fue secuenciada utilizando la tecnología de Ilumina MiSeq, siguiendo el protocolo del fabricante. Una cepa de referencia de *M. tuberculosis* ATCC H34Rv fue usada como control para el posterior análisis de secuenciación.

Ensamblaje genómico

El proceso global para el análisis de datos del genoma secuenciado inició con los datos crudos arrojados por la secuenciación de nueva generación. El programa FastQC se utilizó como una herramienta de control de calidad en los datos secuenciados [4]. Las bases de baja calidad encontradas en los extremos de las secuencias fueron recortadas usando el programa Trimmomatic [5]. Posteriormente, las lecturas filtradas de buena calidad se ensamblaron de novo utilizando el ensamblador genómico SPAdes [6] . Utilizando este software se optimizaron los valores de los k-mers. Para realizar un análisis de los datos generados por el programa SPAdes en el ensamblaje se utilizó el software QUAST como herramienta de evaluación de la calidad [7].

Mapeo genómico y análisis de mutaciones

Las lecturas de alta calidad del genoma secuenciado fueron alineadas contra el genoma de referencia *M. tuberculosis* H37Rv utilizando el software BWA (Burrows-Wheeler Aligner) [8]. Un sub-programa dentro del mismo software llamado SAMtools se utilizó para generar un archivo en formato VCF en el cual se muestran las mutaciones encontradas y otras características necesarias para comprobar la fiabilidad de la mutación [9,10] . Gracias a este archivo se puede ubicar la mutación en el gen que se encuentra dentro del genoma de *M. tuberculosis* y analizar si esta mutación está relacionada con la resistencia fármacos. Se tuvo que comparar cada uno de los genes en los que se encontraron mutaciones con la base de datos de mutaciones que causan resistencia de fármacos en Tuberculosis

(https://tbdreamdb.ki.se/Info/) [11] , para observar si estas ya habían sido reportadas en cepas mexicanas, de otro país o si no existía algún reporte.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó bioinformaticamente el genoma completo de una cepa sensible a los fármacos de primera línea que presentó recurrencia en estudios posteriores. Tradicionalmente se estudian cepas fármaco resistente para encontrar nuevas mutaciones dirigidas a fármacos específicos [12,13], sin embargo analizar una cepa sensible que ha tenido recurrencia permite encontrar mutaciones de novo ya que el paciente con la cepa de tuberculosis sensible recurrente no fue contagiado de una cepa ya resistente.

Se realizaron bibliotecas genómicas para el DNA purificado de las cepas de *M. tuberculosis* utilizando el kit Nextera de Illumina, ya que ofrece el único método libre de gel para la preparación de bibliotecas de hasta 12 kb con menor requerimiento de ADN. Es un enfoque ideal para la secuenciación de novo y la detección de la variación estructural. La secuenciación del genoma completo de las cepas de *M. tuberculosis* fue llevado a cabo utilizando la tecnología de Illumina MiSeq ya que combina la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) con un flujo de trabajo revolucionario que le permite pasar del ADN a los datos analizados en poco menos de 8 horas. Ofrece la primera solución de secuenciación de extremo a extremo, la integración de la generación de clúster, la amplificación, secuenciación, análisis de datos en un solo instrumento y es ideal para el tipo de bacteria que se desea analizar[14].

El primer análisis que se llevó a cabo después de la secuenciación fue la evaluación de la calidad de los datos generados y realizar un recorte de secuencias, las lecturas directas arrojadas por el secuenciador no son fiables ya que comúnmente presentan errores como INDELS, lecturas de mala calidad y contaminación de los adaptadores. Estos errores son muy comunes en la secuenciación de datos y todas las plataformas son susceptibles a un amplio rango de errores químicos e instrumentales. El software que se utilizó para realizar el recorte de secuencias fue Trimmomatic ya que está especialmente diseñado para analizar las secuencias que nos da como resultado la tecnología de Illumina.

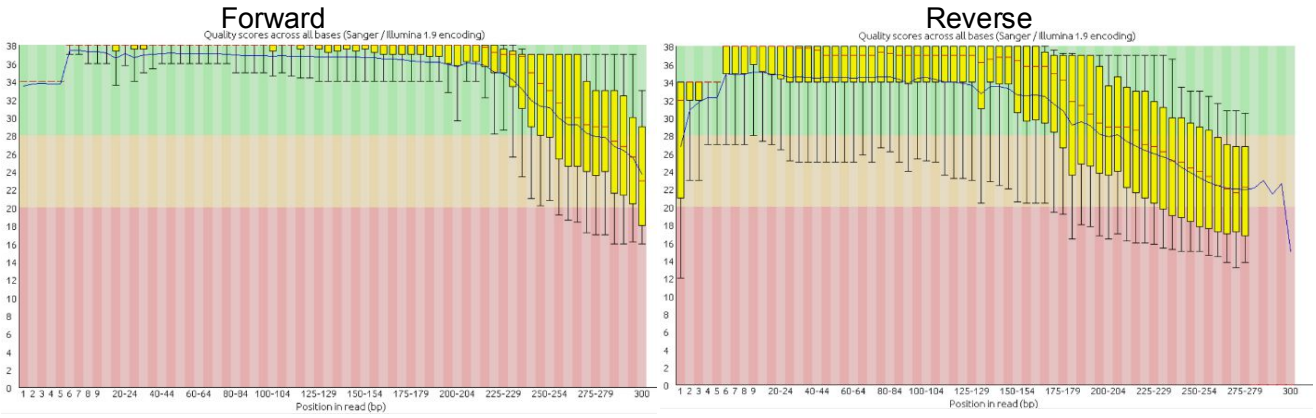


Figura 1. Gráfico de la calidad de la secuenciación de la secuencia forward y reverse, después de haber realizado el recorte de secuencias.

Se realizó el ensamblaje del genoma secuenciado utilizando el software SPAdes, un programa ideal para el análisis de un genoma complejo, proporcionando información sobre genomas de bacterias que supera ampliamente lo que puede obtenerse a través de estudios tradicionales de metagenómica. Se obtuvieron archivos con los contigs generados para los k-mer de tamaños 77 y 127. Se realizó un análisis del ensamblaje del genoma que se hizo con el programa SPAdes utilizando el software QUAST, herramienta de asesoría de calidad. Se realizó el análisis con los diferentes archivos generados para poder hacer una tabla de comparación entre las diferentes longitudes de k-mer y los archivos con y sin trimming (Figura 2).

SPAdes assembler	*# contigs*	*Largest contig*	Total length	*N50*
Raw data				
K-mer 77	1929	26482	3652156	3040
K-mer 127	1941	26532	3646603	3053
Trimmed data				
K-mer 77	1822	17211	3050641	2405
K-mer 127	1831	17211	3055881	2426

Figura 2. Análisis del ensamblaje realizado para *M. tuberculosis* de los datos con y sin trimming.

Para el mapeo del genoma de *M. tuberculosis* contra la secuencia de referencia que se descargó de NCBI (H37Rv) se utiliza el software BWA para generar un archivo en formato SAM, que sirve para almacenar secuencias alineadas, sin embargo el archivo SAM se necesita transformar a otro archivo ordenado y de fácil visualización. Utilizando el programa SAMtools, se convirtió el archivo SAM en un archivo BAM, que es una versión binaria del archivo SAM. El software SAMtools genera al mismo tiempo un archivo VCF en donde se encuentran enlistadas todas las mutaciones que se encontraron al momento de realizar el mapeo génico.

Se descartaron todas aquellas mutaciones que al evaluar su profundidad (DP) presenten un valor menor a 10. De acuerdo con los resultados obtenidos al estudiar las mutaciones, se pueden enumerar 10 genes que se encuentran involucrados: *PPE7, Rv0600c, mshD, echa6, irtB, nadB, Rv2206, recO, Rv2792c* y *mutY.* Así mismo se investigó la función, la proteína a la que codifica o producto y la categoría funcional a la que esta proteína pertenece. Y al comparar estas mutaciones con las ya reportadas en la base de datos, no hubo ninguna coincidencia con las 1178 mutaciones reportadas a nivel mundial hasta el momento. (Figura 3)

No	Posición de la mutación	Profundidad	Cambio de base	Gen	Función	Producto	Categoría funcional	Ubicación del gen	Longitud del gen (pb)
1	424320	11	A > G	PPE7	Familia de la proteína PPE	Familia de la proteína PPE	PE/PPE	424269 - 424694	426
2	698054	13	T > A	Rv0600c	Parte sensor de un sistema regulador de dos componentes.	Componente de la Histidina quinasa	Proteína reguladora	697904 - 698410	507
3	912095	10	G > T	mshD	Participa en el cuarto paso de la biosíntesis de micotiol	Micotiol acetiltransferasa	Intermediario en el metabolismo y respiración	911736 - 912683	948
4	1008912	10	C > T	echa6	Podría oxidar ácidos grasos usando componentes específicos	Enoil-CoA hidratasa	Metabolismo de lipidos	1008207 - 1008938	732
5	1516042	12	G > A	irtB	Responsable del acoplamiento de energía al sistema de transporte de Fe y de la translocación del sustrato a través de la membrana	Transporte de Fe por sistema ABC	Pared celular y procesos celulares	1515623 - 1517362	1740
6	1796657	10	G > T	nadB	Cataliza la oxidación de L-aspartato a imino aspartato que se condensa con fosfato de dihidroxiacetona a quinolinato bajo la acción de quinolinato sintasa	L-aspartato oxidasa	Intermediario en el metabolismo y respiración	1795805 - 1797388	1584
7	2471160	11	C > T	Rv2206	Proteína transmembrana conservada	Proteína transmembrana conservada	Pared celular y procesos celulares	2470622 - 2471332	711
8	2644220	11	C > A	recO	Involucrada en la reparación del ADN y recombinación de la ruta de RECF	Proteína de reparación del ADN	Da información en rutas	2643461 - 2644258	798
9	3102110	10	T > C	Rv2792c	Previene la cointegración del ADN extraño anres de su integración en el cromosoma.	Resolvasa	Secuencias de inserción y fagos	3101581 - 3102162	582
10	4031246	13	G > A	mutY	Implicada en la reparación por escisión de base. Elimina la adenina mal apareada y puede reparar desajustes de A.G y A.C por escisión de adenina	Adenina glicosilasa	Da información en rutas	4030493 - 4031407	915

Figura 3. Tabla de análisis de mutaciones.

CONCLUSIONES

Se integró un banco de ADN genómico, purificado y cuantificado de todas las cepas de *M. tuberculosis* que se tenían en el laboratorio. Se construyeron bibliotecas genómicas del ADN purificado y se realizó una secuenciación de nueva generación de los genomas completos de las cepas de tuberculosis circulantes del año 2013-2015 del estado de Jalisco. Se implementó un protocolo utilizando herramientas bioinformáticas para el mapeo génico de genomas de *M. tuberculosis* secuenciados por la tecnología Ilumina MiSeq contra el genoma de referencia H37Rv. Se ensambló y se realizó un mapeo génico del genoma de una cepa sensible recurrente de *M. tuberculosis* del estado de Jalisco. Se describieron las funciones de los genes en los cuales se identificaron las mutaciones encontradas en el genoma de mi cepa sensible analizada y al comparar estas mutaciones con las ya reportadas en la base de datos, no hubo ninguna coincidencia.

REFERENCIAS

[1] WHO, "Global tuberculosis report," World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014.
[2] Zhao Y, et al. "National survey of drug-resistant tuberculosis in China". *N Engl J Med* 366:2161–2170. 2012.
[3] Adane K, Ameni G, Bekele Sh, et al. "Prevalence and drug resistance profile of Mycobacterium tuberculosis isolated from pulmonary tuberculosis patients attending two public hospitals in East Gojjam zone, northwest Ethiopia". *BMC Public Health* 15:572. 2015
[4] FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics Web site. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
[5] Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. "Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data".

Bioinformatics, btu170. 2014.

[6] Bankevich A et al. "SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing". *Journal of Computational Biology.* 19(5): 455-477. 2012

[7] Gurevich A. et al. Tesler, "QUAST: quality assessment tool for genome assemblies". *Bioinformatics*. 29 (8): 1072-1075. 2013.

[8] Li H. and Durbin R. "Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform". *Bioinformatics*, Epub. 2010.

[9] Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. "The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools". *Bioinformatics*, 25, 2078-9. 2009.

[10] Li H A "Statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data". *Bioinformatics*. 1;27(21):2987-93. Epub 2011.

[11] Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. "Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database". *PLoS Med* 6(2). 2009.

[12] Ramaswamy S. "Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in M. tuberculosis". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 1241–1250. 2003.

[13] Srivastava S., et al; "Emb nucleotide polymorphisms and the role of embB306 mutations in Mycobacterium tuberculosis resistance to ethambutol". *Int J Med Microbiol*. (4):269-80. 2009.

[14] Tyler AD et al; "Comparison of Sample Preparation Methods Used for the Next-Generation Sequencing of Mycobacterium tuberculosis". *PLoS One*. 5;11(2). 2013.

Este estudio fue apoyado por CONACYT a través del proyecto PDCPN-2014-247879, Proyectos de Desarrollo Científico para Atención de Problemas Nacionales.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE 2 CEPAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO ESTIMULANTES Y PROMOTORES DE GERMINACIÓN SOBRE SEMILLAS DE TOMATE SILVESTRE (*Physalis sp*.).

Martínez-Ortíz, S.G., Marín-Sánchez, J., Delgado-Sánchez, P., Ortíz-Rodríguez, J.C. y *Villegas-Rodríguez, F.

Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Km. 14.5 Carretera San Luis Potosí, Matehuala, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, S.L.P., Apdo. Postal 32, CP. 78321.

*Autor para correspondencia: fabiola.villegas@uaslp.mx

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Los entomopatógenos fúngicos son importantes reguladores de las poblaciones de insectos [1]. Se ha demostrado que pueden comportarse como endófitos tanto naturalmente como en respuesta a diversos métodos de inoculación [2]. Recientemente se expuso que desempeñan múltiples papeles en la naturaleza, desde antagonistas de patógenos de plantas hasta asociaciones en la rizosfera, e incluso agentes promotores de crecimiento de plantas [3]. Entre los principales problemas que restringen la producción del tomate de cáscara es la propagación por semilla, ya que es limitada por su baja viabilidad y baja tasa de germinación [4]. Capull en 2003 demostró que con la aplicación de *Trichoderma viridese* en *Coffea arábica L*. var. Caturra Rojo, se logró estimular la germinación de las semillas, entre 34,2 % y 39,2 % a los 50 días de la siembra [5]. En el presente estudio se determinó el porcentaje de germinación de semilla de tomate silvestre de cáscara (*Physalis sp*) inoculada con cuatro cepas de hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana* (BB42 y BB09) y *Metarhizium anisopliae* (Ma25 y Ma28) en una concentración de 1×108 conidios ml-1, para ello se contabilizaron con la ayuda del hematocitómetro para su posterior ajuste. La desinfección de semilla superficial se realizó por inmersión consecutiva durante 3 min. en cloro al 10% y 3 min. en alcohol al 70% terminando cada procedimiento con 3 lavados de agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron 20 semillas por caja Petri con agar-agua. Se evaluaron cuatro cepas más el testigo, el cual fue agua destilada con INEX-A® con cinco repeticiones para cada tratamiento, en un arreglo completamente al azar. Se registró diariamente la germinación durante 22 días, sometiéndose los datos a un análisis de varianza (α= 0.05) y prueba DMS de valor homogeneizado (0.619). Obteniéndose que la cepa MA28 fue la de mayor eficacia (7.4a). El tratamiento de menor eficiencia fue el testigo (2.8d). Los porcentajes de las cepas BB42, BB09 y MA25 oscilan entre 5.8% y 4.8% (5.8b, 5.2bc y 4.8c respectivamente). Si bien es cierto que existen diferentes técnicas y microrganismos para mejorar la capacidad germinativa de los diferentes cultivos, cada una depende de las condiciones en que se manejen. Cubillos indicó que *Trichoderma harzianum*, cepa nativa (TCN-0014) y comercial (TCC-005), fueron inoculadas en semillas de *Passiflora edulis* var. flavicarpa mostrando un mayor efecto estimulador de la germinación in vitro de las semillas. Resalto que la cepa nativa mejora la germinación, disminuye el tiempo promedio de germinación hasta 3 días [6].

Palabras clave: hongos entomopatógenos; semillas; germinación; especies silvestres; endófitos.

REFERENCIAS

[1] F. E. Vega, N. V. Meyling, J. J. Luangsa-Ard, and M. Blackwell, Fungal entomopathogens, Second Edi. Elsevier, 2012.

[2] F. E. Vega, "Insect pathology and fungal endophytes," J. Invertebr. Pathol., vol. 98, no. pp. 277–279, 2008.

[3] F. E. Vega et al., "Fungal entomopathogens: new insights on their ecology," Fungal Ecol., vol. 2, no. 4, pp. 149–159, 2009.

[4] F. Ramírez-Godina, V. Robledo-Torres, R. Foroughbakhch-Pournavab, A. Benavides-Mendoza, and M. A. Alvarado-Vázquez, "Viabilidad de polen, densidad y tamaño de estomas en autotetraploides y diploides de physalis Ixocarpa," Bot. Sci., vol. 91, no. 1, pp. 11–18, 2013.

[5] R. Cupull, C. Andreu, C. Pérez, Y. Delgado, and C. María, "Efecto de Trichoderma viride como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de Rhizoctonia solani Kuhn," no. 1, pp. 21–25, 2003.

[6] J. Cubillos-Hinojosa and N. Valero, "Trichoderma harzianum como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (Passiflora edulis var . flavicarpa Degener)," Agron. Colomb., vol. 27, no. 1, pp. 81–86, 2009.

ESTUDIOS FILOENZIMÁTICOS DE ANTOCIANINAS EN *Zea mays L.* Y OTROS ORGANISMOS PARA EVITAR EL AUMENTO DE HIPERTROFIA DE LOS ADIPOCITOS EN HUMANOS CON DIETA RICA EN GRASAS. ("STUDIES FILOENZYMATIC OF ANTHOCYANINS IN *Zea mays L.* AND OTHER ORGANISMS TO AVOID THE INCREASE OF HYPERTROPHY OF ADIPOCYTES IN HUMAN WITH HIGH FAT DIET").

[1+]Mora-Vázquez, José A., [1,2*]Brena-Becerril, Alejandro.

1. Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 N°595 carretera Tlajomulco-Santa Fe, Lomas de Tejeda, Tlajomulco Jalisco.
2. Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Jalisco. Plantel 16, Km 3.2 Carretera a San Isidro Mazatepec. Santa Cruz de las Flores, Tlajomulco de Zúñiga, Jal. CP45640

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com
+Autor que presentó el trabajo.

Área del conocimiento: Biotecnología

ABSTRACT
Anthocyanins are a group of pigments responsible for the coloration of certain plants, fruits and seeds. A key molecule for the synthesis of anthocyanins is known to be Dihydroflavonol-4-reductase (DFR), precursor molecule of anthocyanins including Cyanidin-3-0-β-glucoside (C3G), which is attributed great benefits to The human health by its antioxidant activity, as the null increase of hypertrophy of the adipocytes, to avoid the incidence of colon cancer, among others, which is found in the purple corn, plant native to America. In this project the research is carried out with bioinformatic programs of organisms homologous to Zea mays L. that have the key molecules for the synthesis of said anthocyanin, for this the search of the sequence of the molecule DFR was carried out in the NCBI where We performed a BLASTp for the search of organisms homologous to the purple corn, with which an FASTA file was made to later make an alignment in ClustalX and thus make the phylogenetic tree with the Neighbor-Joining method, the development of this bioinformatic search in Allowed to find those organisms that are food of vegetal origin for the humans that count on the precursor molecule of the anthocyanin synthesis, in order to complement their feeding and to avoid the hypertrophy increase of the adipocytes, even though carrying a diet high in fat.

Keywords: Corn purple; anthocyanins; hypertrophy of adipocytes; bioinformatics; Zea mays L.

RESUMEN
Las antocianinas son un grupo de pigmentos encargados de la coloración de ciertas plantas, frutos y semillas. Se sabe que una moléculas clave para la síntesis de antocianinas es la Dihidroflavonol-4-reductasa (DFR), molécula precursora de antocianinas entre ellas Cianidin-3-0-β-glucósido (C3G), a la cual se le atribuye grandes beneficios para la salud humana por su actividad antioxidante, como el nulo aumento de hipertrofia de los adipocitos, evitar la incidencia del cáncer de colón, entre otros, la cual se encuentra en el maíz morado, planta oriunda de América. En este proyecto se realiza la búsqueda con programas bioinformáticos de secuencias homologas de esta proteína en *Zea mays L.,* en otros organismos que cuenten con las moléculas clave para la síntesis de dicha antocianina, para esto se llevó

a cabo la búsqueda de la secuencia de la molécula DFR en el NCBI donde se realizó un BLASTp para la búsqueda de organismos homólogos al maíz morado, con los cuales se hizo un fichero FASTA para posteriormente hacer un alineamiento en ClustalX y así realizar el árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining, el desarrollo de esta búsqueda bioinformática nos permitió encontrar aquellos organismos que son alimento de origen vegetal que cuentan con la molécula precursora de la síntesis de la antocianina, para así recomendar y complementar la alimentación de los humanos y evitar el aumento de hipertrofia de los adipocitos, aun así llevando una dieta alta en grasas.

Palabras clave: Maíz morado; Antocianinas; Hipertrofia de los adipocitos; Bioinformática; Zea Mays L.

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son un grupo de pigmentos encargados de la coloración de ciertos frutos, plantas y semillas, químicamente son glucósidos de las antocianidinas, las cuales están constituidas por una molécula de aglicona, a la cual se le une un azúcar por medio de un enlace β-glucosídico [1]. Una molécula clave para la síntesis de antocianinas es la Chalcona Sintasa la cual está presente en la ruta biosintéticas del ácido siquímico que da paso a la síntesis de compuestos flavonoides, como la Dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) molécula precursora de las antocianinas entre ella la Cianidin-3-0-β-glucósido (C3G), en primer lugar para su síntesis, la vía ascendente fenilpropanoide convierte el sustrato L-fenilalanina en 4-cumarato CoA usando fenilalanina amoniasa (PAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumarato CoA ligasa (4CL). A continuación, CoA 4-cumarato es catalizado por chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI) y flavanona-3-hidroxilasa (F3H) para formar dihidroflavonol. Finalmente, dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) cataliza dihidroflavanonas a leucoantocianidinas, que luego se convierten en antocianidina por antocianindina sintasa (ANS). Por lo tanto, DFR es una enzima clave en la biosíntesis de antocianinas [2]. A esta antocianina se le atribuye grandes beneficios para la salud humana por su actividad antioxidante, como el nulo aumento de hipertrofia de los adipocitos, evitar la incidencia del cáncer de colón, disminuye los niveles de colesterol total, entre otros. Esta antocianina se encuentra en el grano de maíz morado (*Zea Mays L.)* planta oriunda de América, constituyó uno de los principales alimentos de las numerosas tribus indígenas en la época precolombina y se le atribuyen diversas propiedades medicinales. Los componentes químicos presentes en el maíz morado son esencias, ácido salicílico, grasas, resinas, saponinas, sales de potasio y sodio, azufre y fósforo, pero ante todo compuestos fenólicos. Además, se ha informado sobre la existencia de cianidina-3-glucósido en la semilla del *Zea mays L* variedad morado, como la principal antocianina (flavonoide) contenida en este fruto [3]; se caracteriza por su atractivo color y sus excelentes propiedades funcionales, el cual aporta cantidades importantes de almidón, cerca del 80%, un 10% de azúcares los cuales le confieren un sabor dulce, un 11% de proteínas, 2% de minerales y vitaminas (complejo B y ácido ascórbico) concentrados en el endospermo [4]. Diversos estudios epidemiológicos apoyan la relación entre el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos, como el *Zea mays* L., y una baja incidencia de enfermedad cardiaca coronaria, ateroesclerosis y ciertas formas de infarto y cáncer. [5], [6], [7]. Recientemente, se ha reportado que estos alimentos tienen actividad antioxidante y pueden mejorar los perfiles lipídicos en modelos experimentales [8]. Este trabajo tiene como objetivo el realizar una búsqueda, con programas bioinformáticos de secuencias homologas de esta proteína en *Zea mays L.,* en otros organismos que cuenten con las moléculas clave para la síntesis de dicha antocianina, Cianidin-3-0-β-glucósido (C3G) por sus propiedades farmacológicas y terapéuticas que se le atribuyen como el nulo aumento de hipertrofia de los adipocitos, evitar la incidencia del cáncer de colón, reducción del colesterol entre otros, obteniendo estos beneficios consumiendo aquellos alimentos que cuenten con

esta antocianina, para así complementar las dietas de los humanos aun teniendo una alimentación alta en grasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en los laboratorios de bioinformática de la Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara (UPZMG) durante el periodo cuatrimestral del mes Mayo 2017 al mes Agosto 21 del 2017, donde se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

Materiales

Se utilizaron las herramientas bioinformáticas ClustalX, BioEdit y Mega4, así como páginas especializadas en bioinformática como el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y MaizeGDB, las secuencias de la molécula Dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) con número de identificación NP_ 001152467.2 para la búsqueda de organismos homólogos como posibles candidatos a tener la antocianina Cianidin-3-0-β-glucósido (C3G).

Metodología

Se realizó la búsqueda de la secuencia de proteína de la molécula Dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) con número de identificación NP_001152467.2 perteneciente al *Zea mays L.* en la base de datos del NCBI, esta secuencia se guardó en formato FASTA para así posteriormente hacer un BLASTp (Protein Basic Local Alignment Search Tool) para la búsqueda de organismos homólogos al maíz morado que cuenten con dicha proteína, al finalizar la búsqueda en el NCBI se seleccionaron 28 organismos homólogos basándonos en su porcentaje de identidad, con los cuales se hizo nuevamente un fichero FASTA, para así posteriormente realizar el alineamiento de las secuencias en ClustalX, donde se observa el grado de similitud entre los aminoácidos que ocupan una posición concreta en la secuencia, el refinamiento del alineamiento de las secuencias se llevó a cabo mediante BioEdit, para así realizar un árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining (unión al vecino) visualizándolo en MEGA 4 donde se le dio formato para la realización de su interpretación.

RESULTADOS

Se obtuvo una recopilación total de 28 secuencias de organismos homólogos al *Zea mays L.* en su mayoría pertenecientes al mismo orden, *Poales* un 67.90% (*Zea mays, Dichanthelium, Sorghum, Setaria, Aegilops, Triticum, Thinopyrum, Hordeum, Oryza* y *Ananas*), *Asparagales* 10.71% (*Asparagus, Muscari* y *Hyacinthus*), *Aracelas* 7.14% (*Phoenix* y *Elaeis*), Liliales 7.14% (*Lilium* y *Tulipa*), *Zingiberales* 3.60% (*Musa*) y *Solanales* 3.60% (*Petunia*), esta búsqueda nos ayudó a encontrar aquellos organismos que cuentan con la molécula DFR precursora de las antocianinas, el alineamiento realizado en ClustalX y BioEdit se observa el porcentaje de columnas parsimoniosas donde en su mayoría 127 columnas de aproximadamente 326 se obtuvieron con un 100% de identidad o similitud, 84 columnas con 90% y 26 columnas de 70% a 89% de similitud, se observa la presencia de gaps lo cual nos indica la existencia de indeles, las zonas con mayor presencia de gaps están ubicadas en la posición 45 a 53 con la excepción de la secuencia del *Aegilops bicronis* (no tiene presencia de gaps), y en la posición 132 a 136 con excepción del *Sorghum bicolor* (no cuenta con presencia de gaps), estos gaps son necesarios para mantener la correspondencia entre los sitios homólogos y nos indican la posible presencia de mutaciones puntuales durante su evolución, llamados "indeles" ya no se sabe con certeza si existió inserción o delección de nucleótidos en la secuencia, las zonas con mayor coincidencia y/o similitud están ubicados entre las

posiciones 10 a 44 y 54 a 344, mientras tanto las de menor coincidencia se ubican entre las posiciones 1 a 9 y 345 a 377, obteniendo aun así en su mayoría secuencias con 100% de similitud.

Los espacios en blanco unidos con un "-"(guion medio) representan las zonas con gaps, las dos secuencias que se observan en el alineamiento que no cuentan con gaps (*Aegilops bicronis y Sorghum bicolor*) nos dice que existió inserción en su secuencia de nucleótidos, mutaciones puntuales a lo largo de su evolución.

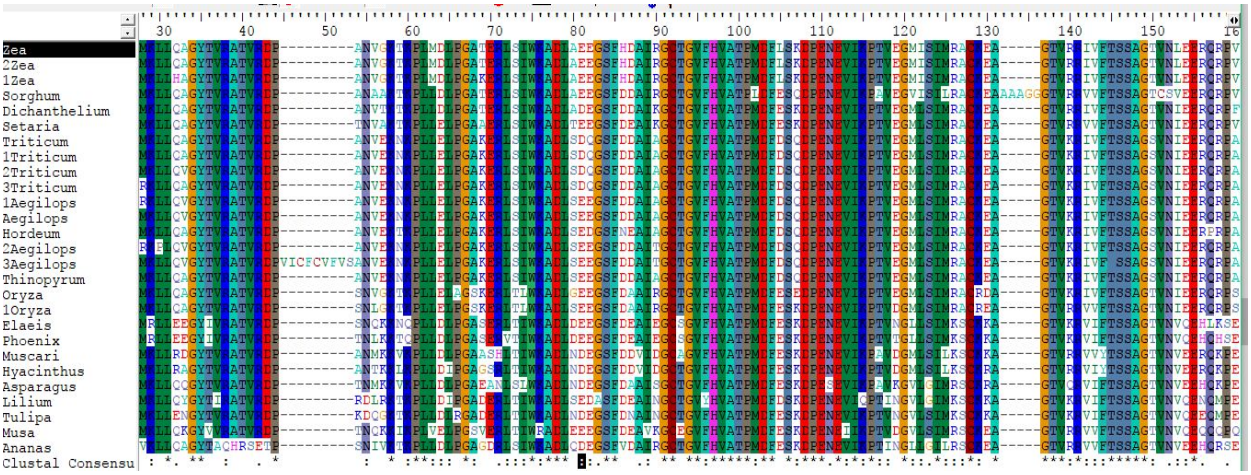


Figura 1.- Fragmento del alineamiento múltiple obtenido con la colección de 27 secuencias homólogas, siendo las columnas de colores las representantes de un 90-100% de similitud, y el resto de las columnas de 70-89%.

Para la elaboración del árbol filogenético realizado en ClustalX y visualizado y editado en Mega4 se omitieron las regiones con gaps y se trabajó solo con las regiones conservadas, el dendograma obtenido clasifica las secuencias en tres grupos, en el grupo 3 (G3) sólo se encuentra el organismo *Petunia x hybrida* perteneciente al orden *Solanales*, única de este orden encontrada con alta homología al *Zea mays* (99%) colocándola como raíz junto con los *Zea mays* en el dendograma, en el grupo 1 (G1) están los 3 organismos *Zea mays,* clado donde se ubica nuestra sonda, siendo estos 3 organismos del mismo orden, *Poales*. En el grupo 2 (G2) siendo el más extenso, se encuentran el resto de los organismos, en su mayoría del orden *Poales*, para su interpretación este grupo se dividió en subgrupos, en el subgrupo 1 (S1) solo se encuentra el organismo *Sorghum bicolor* perteneciente al orden *Poales*, en el subgrupo 2 (S2) el cual fue dividido en más subgrupos están; en el S 2.2 están ubicados *Setaria* y *Dichanthelium*, del orden *Poales*, y en el S 2.1 como primera ramificación están los *Oryza* del orden *Poales*, como segunda ramificación en un primer clado se encuentran todos los organismos pertenecientes al orden *Liliales, Asparagales, Arecales, Zingiberales* y un organismo del orden *Poales* (*Ananas comosus*) único de su especie relacionado con el resto de la clasificación colocado en esa posición, como un segundo clado en este mismo subgrupo están el resto de los organismos *Poales*, los *Aegilops, Triticum, Thinopyrum* y *Hordeum.*

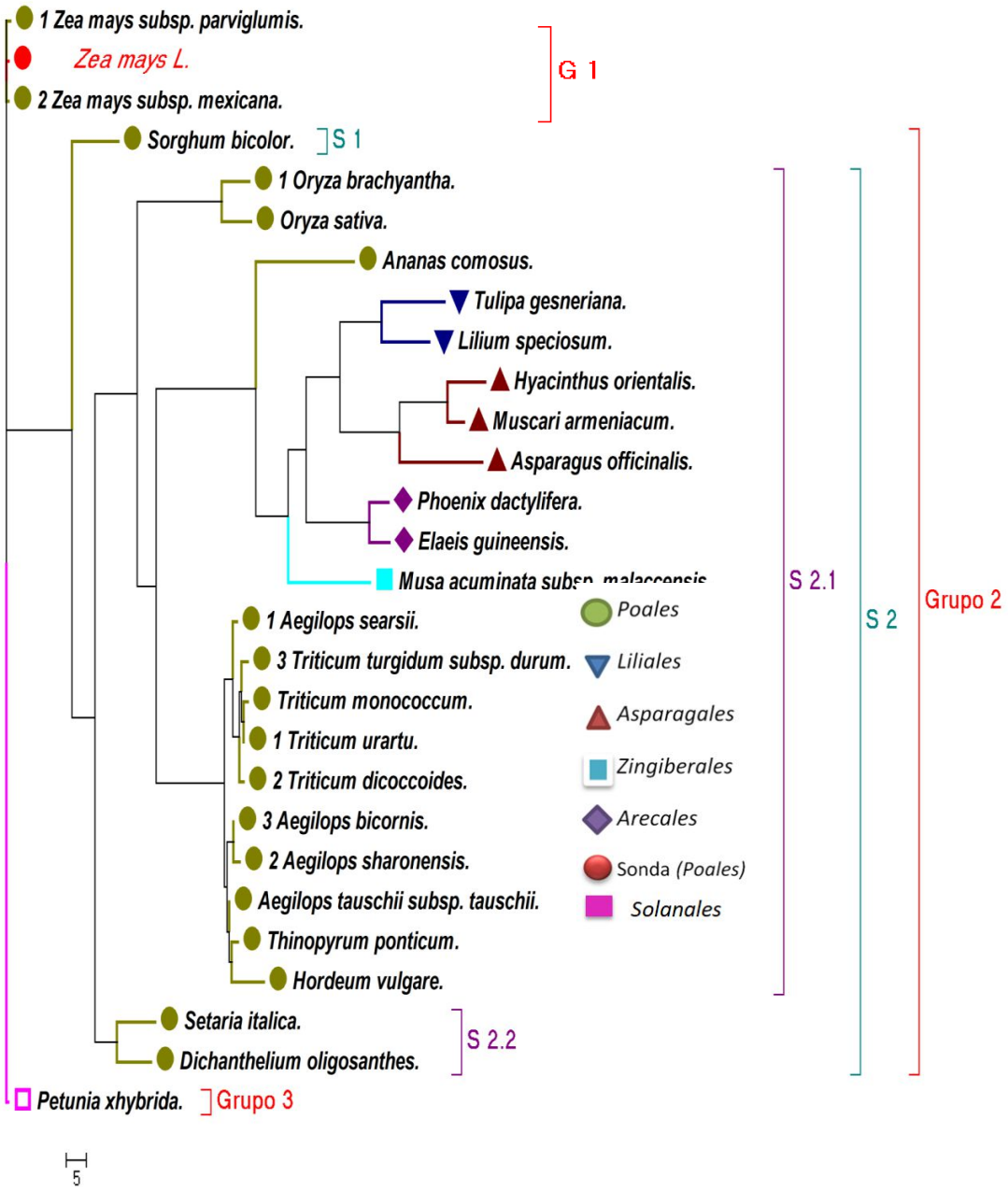


Figura 2.- Árbol filoproteico obtenido con el método de máxima verosimilitud donde se observan las divisiones (grupos y subgrupos) en las que el árbol clasifica las secuencias. Los números en la base de cada rama indican la longitud de estas y los signos ubicados a su izquierda representan al orden perteneciente de su clasificación taxonómica.

CONCLUSIONES

La obesidad se desarrolla cuando el consumo energético supera el gasto energético. Promover la formación y función del tejido adiposo aumenta el gasto energético y puede proteger contra la obesidad. Cyanidin-3-glucosido (C3G) es un compuesto de antocianina que se produce naturalmente en muchas frutas y verduras [9] como en *Zea mays L.* y para llegar a ello es necesario la presencia de la molécula DFR, es por esto que se utilizó como sonda la secuencia de la proteína DFR del *Zea mays L.* para la búsqueda de organismos homólogos con ayuda de programas bioinformáticos, donde obtuvimos en este extenso análisis los posibles alimentos que pueden llegar a funcionar para evitar el aumento de hipertrofia de los adipocitos al ser consumidos por los humanos, entre ellos se encuentra con mayor homología según el árbol filoproteico los organismos *Zea* y *Petunia,* ya que son colocados como raíz dentro del árbol filoproteico y tienen un 99% de homología según la base de datos del NCBI, *Sorghum bicolor* está ubicado en un solo clado, del mismo nodo del que divergió *Sorghum* divergen otros dos clados, el más pequeño el cual cuenta con los organismos *Setaria* y *Dichanthelium*, el segundo nodo diverge los organismos Oryza y un nuevo nodo con dos clados, aquí el resto de los organismos Poales, y el ultimo clado el cual tiene el resto de las clasificaciones de los organismos, *Liliales, Asparagales, Arecales, Zingiberales* y *Ananas comosus* perteneciente al orden *Poales* es el único organismo de este orden ubicado en este clado se puede decir que es ubicada en este clado gracias a que durante su evolución cuenta con alguna otra función que la emparenta más con el resto de las clasificación que con los organismos de sus mismo orden, ya que del nodo donde diverge, es el mismo nodo del cual divergen los organismos *Liliales, Asparagales, Arecales y Zingiberales.* En resumen tenemos organismos comestibles como lo es el maíz, sorgo, mijo, cebada, espárragos, trigo, arroz, plátano, piña, aceite de palma y el fruto de la palma datilera, que son posibles candidatos a sintetizar aquella antocianina llamada C3G gracias a la presencia de la molécula DFR, para así complementar con estos alimentos de origen vegetal la dieta de los humanos que llevan una alimentación alta en grasas, evitando así el aumento de hipertrofia de los adipocitos, evitar la hiperglicemia, cáncer de colon y ayudar a la reducción de colesterol, realizando un consumo continuo de estos alimentos, para la comprobación de este estudio filoenzimático es necesario hacer las pruebas necesarias en campo/laboratorio para observar si en realidad todos los alimentos ya mencionados o por lo menos algún porcentaje de ellos nos ayuda en los beneficios escritos anteriormente, al igual que estos organismos que son alimentos cotidianos en los humanos, en el análisis sobresalieron organismos no comestibles como plantas de uso ornamental que cuentan con la molécula DFR, por mencionar algunos, el agropio alargado, el Jacinto de uva, Jacinto de jardín y un tulipán, al igual que organismos en peligro de extinción como el *Zea mays subsp parviglumis* y el *Triticum monococcum*.

REFERENCIAS

[1] O. Miguel, R. V. María del Carmen, (2011 Nov) PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS ANTOCIANINAS. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud [online]. 13(21): 16-21. Available: http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-06.pdf

[2] H. Wang, W. Fan, H. Li, (2013 Nov) Functional characterization of Dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. National Center for Biotechnology Information NCBI [online]. 4;8 (11), Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3817210/

[3] A. Jorge; R. Ernesto (2007 Jun) Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (Zea mays L) en ratas hipercolesterolémicas. Scientific

Electronic Library Online – SciELO [online]. 24 (2), Available: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342007000200010

[4] G. S. Jhoselin; M. A. Sigry (2014) Características y propiedades funcionales del maíz morado (Zea mays L.) var. Subnigroviolaceo. Scientia Agropecuaria [online]. 5 (4), 211-215. Available: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172014000400005&script=sci_arttext

[5] D. Cooke, WP. Steward, (2005 Sep) Anthocyans from fruits and vegetables--does bright colour signal cancer chemopreventive activity? National Center for Biotechnology Information NCBI [online]. 41(13):1931-40. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084717

[6] S. Teresa, DA. Moreno, (2010 Apr) Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. National Center for Biotechnology Information NCBI [online]. 11(4):1679-703. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480037

[7] MG. Hertog, EJ. Feskens, (1993 Oct) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. National Center for Biotechnology Information NCBI [online]. 342(8878):1007-11. Available:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8105262

[8] X. Xia, W. Ling, (2006 Aug) An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. National Center for Biotechnology Information NCBI [online]. 136(8):2220-5. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857844

[9] Y. You, J. Zhan, (2017 Jul) Cyanidin-3-glucoside increases whole body energy metabolism by upregulating brown adipose tissue mitochondrial function. National Center for Biotechnology Information NCBI [online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28691397

OBTENCIÓN DE BIOMARCADORES RECOMBINANTES PARA SU USO EN LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ESPECÍFICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.

[1]Ochoa-Mojica, O.R., [2]Aguilar-Lemarroy, A.C., [2]Jave-Suarez, L.F., [1]Padilla-Camberos, E., [1]Oaxaca-Camacho, A.R., [3]Muñoz-Valle, F., [4]Moreno-Brito, V., y [1*]Hernández-Gutiérrez, R.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C., Departamento de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jal., México. C.P. 44270
2. Centro de Investigación Biomédica de Occidente-IMSS, Departamento de Inmunología, Sierra Mojada 800, Independencia Oriente, C.P. 44340 Guadalajara, Jal., México.
3. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jal., México.
4. Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. C. Escorza 900, Col Centro 3100 Chihuahua, México.

*Autor para correspondencia: rhgutierrez@ciatej.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El cáncer de mama representa una de las neoplasias con mayor importancia a nivel mundial. En México, a partir del año 2006, ocupa el primer lugar de mortalidad en mujeres mayores de 25 años, en 2015 se reportó la muerte de aproximadamente 11 mil personas, esto se debe a un diagnóstico tardío, no oportuno de la enfermedad. La identificación, caracterización y validación de biomarcadores con potencial uso para el diagnóstico oportuno del cáncer es de gran importancia puesto que coadyuvarían a reducir los altos índices de mortalidad en la actualidad y los costos de los tratamientos. El objetivo del presente trabajo consistió en la obtención de las proteínas recombinantes A1AT, TPI-1, PRDX-2 y PPIA previamente reportadas como Antígenos Asociados a Tumor presentes en sueros de pacientes con cáncer de mama en etapas tempranas. La expresión y purificación de las proteínas recombinantes se observó con ensayos de "Western Blot" utlizando anticuerpos monoclonales específicos. Las proteínas recombinantes se fijaron sobre membranas de nitrocelulosa para evaluar su capacidad de ser reconocidas por los anticuerpos específicos, estos resultados preliminares indican que es factible su uso o aplicación en la detección de anticuerpos séricos específicos en pacientes con cáncer de mama en etapas tempranas.

Palabras clave: Cáncer; biomarcadores; anticuerpos; diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

Definición del cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento anormal y diseminación de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Es una enfermedad multifactorial, que incluye el desarrollo de etapas múltiples de las células tumorales *(1)*. El cáncer puede ser causado por varios factores genéticos y ambientales, tales como una exposición a químicos carcinogénicos, radiaciones, causas

microbiológicas. Puede diseminarse a otras partes del cuerpo por invasión o mediante metástasis a distancia a través del sistema sanguíneo o linfático *(2)*.

Estadísticas de cáncer en el mundo

El cáncer se posiciona como una de las causas principales de mortalidad y morbilidad en el mundo; en el año 2013 la organización mundial de la salud dio a conocer las cifras mundiales de cáncer durante el 2012, en el cual se reportaron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer y la muerte de 8.2 millones de personas en el mundo. En la figura 1 se observan los principales tipos de cáncer con mayor prevalencia a 5 años en incidencia y mortalidad, dentro de los cuales el cáncer de mama representa el segundo y quinto lugar respectivamente *(3)*.

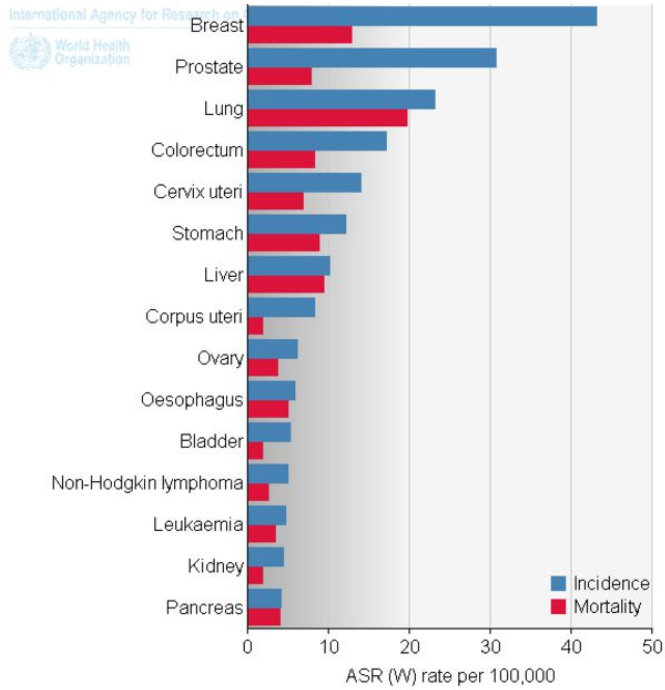


Figura 1. Principales tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial durante el año 2012.

Incidencia y mortalidad de cáncer de mama en México

En México se ha observado un incremento significativo en las últimas dos décadas, a partir del año 2012, el cáncer de mama se posicionó como la principal causa de muerte causada por neoplasias con el 29.6% de los casos, seguido de neoplasias en cuello uterino y órganos digestivos *(4,5)*. Existe una tendencia ascendente de mortalidad en México cada año, tal como se muestra en la figura 2 *(4, 6)*.

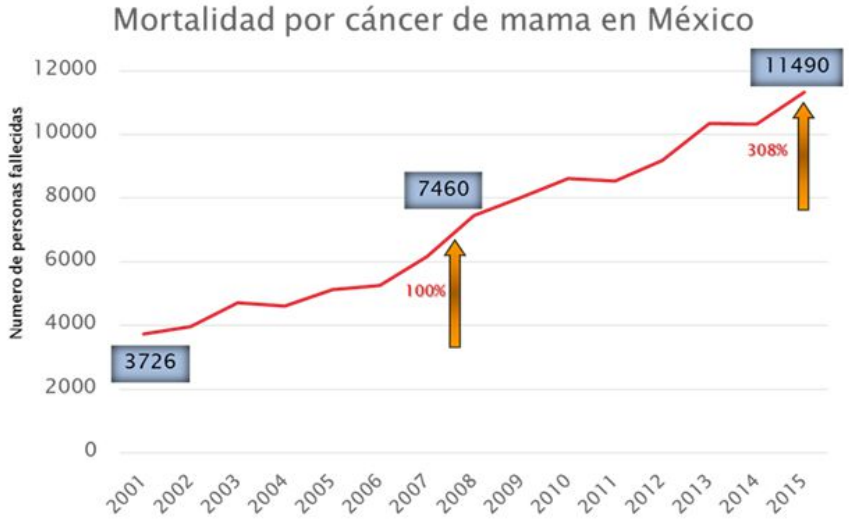


Figura 2. Tasa de mortalidad por cáncer de mama en México en población de 20 años en adelante, 2001 - 2015.

Cáncer de mama

Es el crecimiento descontrolado de un grupo de células cancerígenas que invaden el tejido mamario, generalmente este se puede manifestar como un pequeño bulto en el seno o en algún ganglio aferente, el cual se divide en cuatro estadios (figura 3) *(2)*.



Figura 3. Proporción del tamaño de tumor dependiendo del estadio.

Métodos de diagnóstico

Actualmente existen diversos métodos para la detección de cáncer de mama como: la exploración física, estudios por imagen y biopsias, entre otros, sin embargo para diagnosticar este tipo de cáncer en etapas tempranas puede ser complicado con estos métodos *(6)*.

Biomarcadores

El uso de la mamografía ha demostrado gran eficacia, sin embargo, el valor predictivo de esta disminuye cuando los pacientes presentan tejido mamario denso y lesiones pequeñas, así como en mujeres pre-

menopaúsicas y menores de 40 años *(7)*. El incremento en la efectividad del tratamiento depende del diagnóstico temprano, por lo que se han encaminado los esfuerzos en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico *(8),* tal como los Antígenos Asociados a Tumor *(9, 10)* que se refieren a moléculas expresadas en las células cancerígenas, generalmente proteínas que resultan en la inducción de autoanticuerpos que pueden ser detectados en sangre de los pacientes, algunos reportados previamente en pacientes con cáncer de mama son: Triosa Fosfato Isomerasa (TPI-1) y Ciclofilina A, reportada por científicos japoneses *(11)*; Peroxirredoxina 2 (PRDX-2) reportada por Desmetz y colaboradores *(12)*; Alfa-1-Antitripsina (A1AT) reportada como un biomarcador presente en pacientes con cáncer de mama en México *(13)*. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de estos Antígenos Asociados a Tumor presentes en pacientes con cáncer de mama mediante la expresión y purificación a partir de cepas de *E. coli,* así como la fijación de estos sobre membranas de nitrocelulosa.

Desde hace algunos años la tecnología de miniarreglos sobre los cuales se fijan biomarcadores de interés han demostrado tener un gran potencial como herramientas poderosas en la investigación básica, en el análisis funcional del proteoma, como en el diagnóstico clínico de enfermedades humanas tales como el cáncer; todo esto debido a que tienen gran sensibilidad, son de fácil manejo y no requieren equipos costosos, ni personal altamente capacitado para la interpretación de los resultados *(14, 7, 15, 16)*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las proteínas recombinantes

Para la obtención de las proteínas recombinantes TPI-1, PRDX-2, PPIA y A1AT, se partió de una placa con cuatro colonias con cepas de *E.Coli* BL21, cada una con el inserto correspondiente para expresar la proteína de interés. Se tomó una colonia al azar de cada proteína para obtener un pre-inóculo, el cual se incubo con medio LB durante 18-24 horas a 37 ^{o}C, posteriormente se realizó una inducción de proteínas, la cual consiste en agregar el inductor IPTG a una concentración final de 100 mM en el medio de cultivo. Para confirmar que la inducción se había llevado a cabo, se realizó un gel de poliacrilamida al 13% teñido con azul de Coomassie, para verificar que la proteína se encontrara sobre-expresada en la pastilla celular obtenida de la inducción.

Posteriormente, se lisaron las pastillas celulares con ultra-sonicación con el fin de romper la membrana celular y liberar las proteínas recombinantes de interés. Luego de obtener las dos fracciones (soluble e insoluble), se realizó nuevamente un gel de poliacrilamida al 13% teñido con azul de Coomassie para observar la fracción que contenía mayor cantidad de proteína de interés, si la mayor parte se encontraba en la fracción insoluble se volvía a realizar la lisis y si la mayor cantidad se encontraba en la fracción soluble se continuaba con el proceso de purificación por cromatografía de afinidad, con el uso de columnas de níquel con afinidad a las colas de histidina de las proteínas recombinantes. El cual consiste en la obtención de la proteína de interés únicamente. Con un gel de poliacrilamida al 13% teñido con azul de coomassie se verificó en que fracción se encontraba la proteína de interés.

Luego de obtener las proteínas purificadas, se realizaron geles preparativos de poliacrilamida al 13% para cada proteína (TPI-1, PRDX-2, PPIA y A1AT). Se cortó la banda de interés correspondiente a la proteína, la cual se colocó en una cámara de electroelución para remover la proteína de la acrilamida presente. El protocolo general de obtención de proteínas recombinantes se observa en la figura 4.

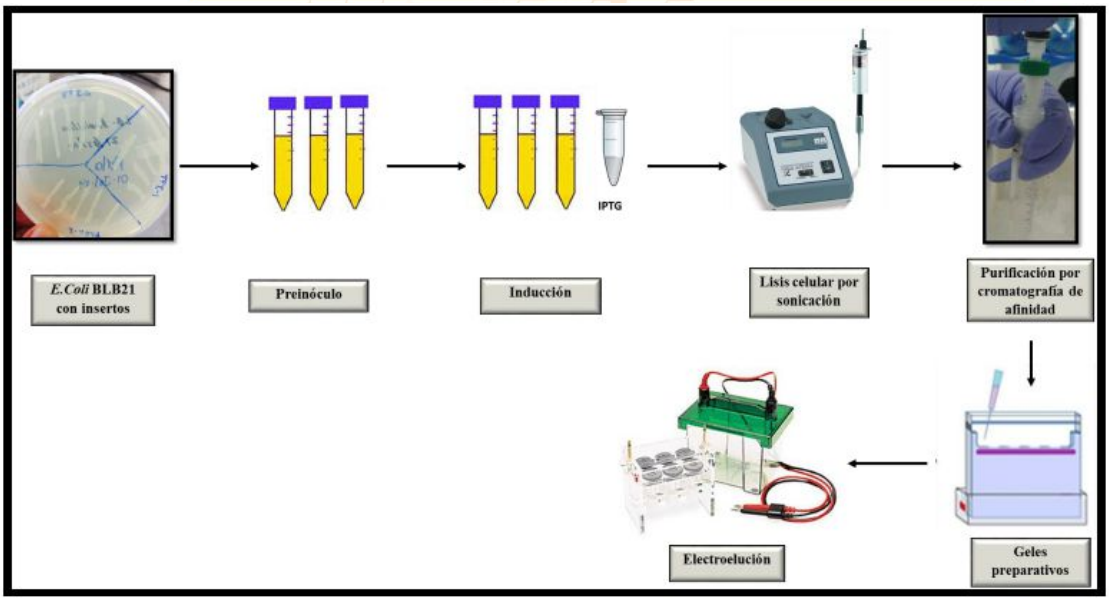


Figura 4. Diagrama de flujo para la obtención de las proteínas recombinantes TPI-1, PRDX-2, PPIA y A1AT.

Western blot

Estos ensayos se utilizaron para determinar la presencia de las proteínas recombinantes en los procesos de inducción o síntesis y de purificación, el cual consistía en la transferencia de las proteínas separadas por medio de un gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa para reconocer proteínas por medio de anticuerpos. Se utilizó el anticuerpo monoclonal comercial α-His de ratón, con una dilución de 1:1000 como anticuerpo primario y el anticuerpo comercial α-IgG de ratón a dilución 1:2000 como anticuerpo secundario.

Precipitación de proteínas

Las proteínas electroeluídas se encontraban en solución con azul de Coomassie, el cual era necesario retirar para no causar interferencias en la fijación de las proteínas por medio de vacío. Se utilizaron las soluciones concentradas de las proteínas A1AT, TPI-1, PRDX-2 y PPIA, se agregaron 5 volúmenes de acetona en cada una y se dejó precipitando durante 24 horas, posteriormente se centrifugo la muestra a 13,000 RPM/15 min, se realizaron tres lavados con acetona y por último se resuspendió la proteína precipitada con agua ultrapura.

Impresión de proteínas por medio de vacío

Para fijar las proteínas en una membrana de nitrocelulosa se utilizó el equipo "Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus" que consiste en una cámara conectada a una bomba de vacío que contiene por dentro la membrana de nitrocelulosa. La muestra con la proteína se agregó por la parte superior del equipo para que quedara sobre la membrana de nitrocelulosa, después se conectó la bomba de vacío para que se fijara sobre la membrana de nitrocelulosa. Una vez absorbidas, se agregó agua desionizada para fijar mejor las proteínas contenidas en la muestra. En la figura 5 se observa el esquema general de cómo se colocó el equipo.

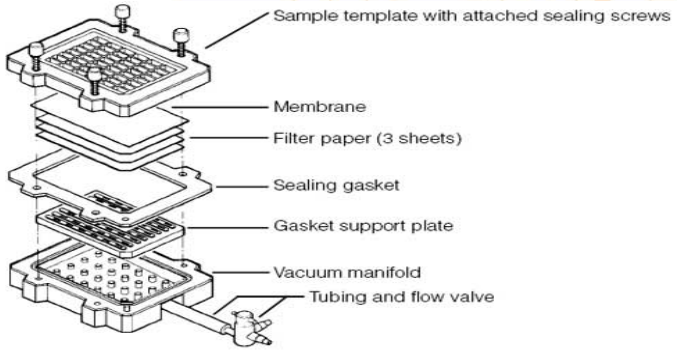


Figura 5. Esquema de colocación de equipo "Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus"

Cuantificación de proteínas con equipo "NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer"
Se realizó un ensayo de cuantificación para TPI-1, PRDX-2, PPIA, A1AT y Trastuzumab, con el objetivo de tener aproximadamente la misma concentración en los 4 casos respectivamente, además de obtener un revelado intenso con la menor cantidad de proteína posible. Se tomó como referencia el trabajo publicado en el año 2008 por *W. Liu et al. (37)*, en el cuál utilizaron 100 ng/ml para cada proteína.

Se partió de un stock electroeluído de cada proteína previamente precipitada con acetona y resuspendida en agua ultrapura. También se cuantificó Trastuzumab como control y referencia para las lecturas de las proteínas, ya que este stock contenía una concentración conocida. Para cuantificar las proteínas, se utilizó el equipo "NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer" como se observa en la figura 6, utilizando el programa "Purified Protein" (280 nm); luego de obtener las lecturas, se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones finales de 250, 500 y 750 ng/ml para cada stock, incluyendo Trastuzumab y con esto poder determinar la cantidad adecuada.

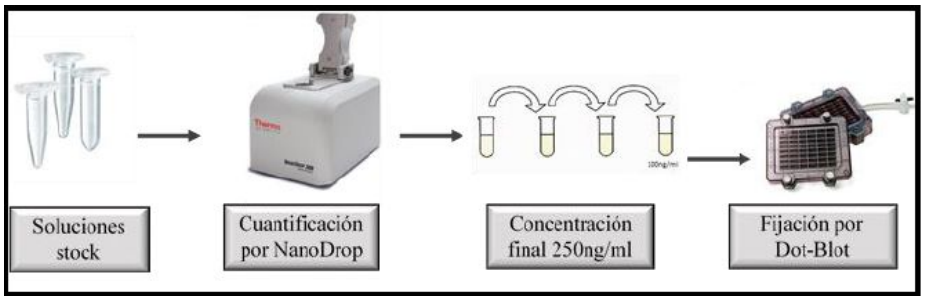


Figura 6. Protocolo de cuantificación de proteínas con equipo "NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer"

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Obtención de proteínas recombinantes
Después de haber realizado la inducción con IPTG para sobreexpresar las proteínas de interés, se realizó un gel de poliacrilamida al 13% para comprobar que la proteína fue sobreexpresada, colocando de cada proteína un control positivo (inducida) y un control negativo (no inducida/sin IPTG) para comparar. Dicho gel se muestra en la figura 16. Se utilizó el marcador de peso molecular "SDS-PAGE standars, broad range" de Bio-rad para poder distinguir cual era la banda de interés según el peso de cada

proteína; se puede observar en la figura 7 bandas intensas en las muestras con proteínas TPI-1, PRDX-2 y PPIA inducidas lo cual indica que efectivamente hubo sobreexpresión para las proteínas recombinantes.

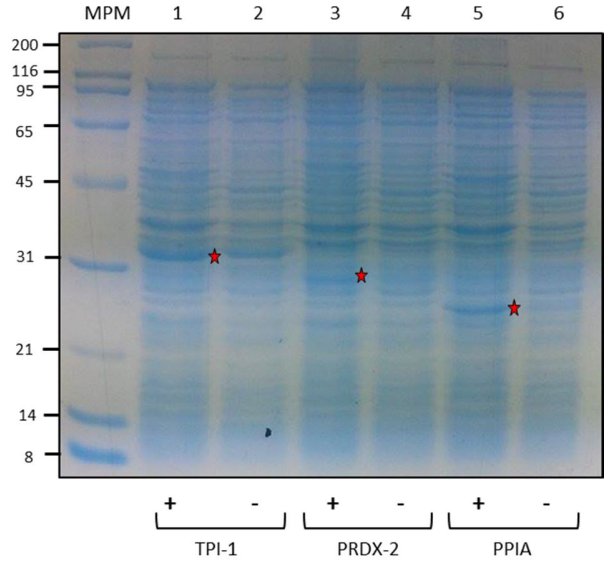


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 13% con inducción de proteínas.

Después de realizar la lisis celular mediante sonicación, la purificación por cromatografía de afinidad, la electroelución y la precipitación con acetona, se realizó un gel de poliacrilamida al 13% para obtener un aproximado de la cantidad de proteína con la que se contaba según la intensidad de la banda, además de observar la presencia de algún contaminante en el stock de proteínas. Se muestra en la figura 8, dicho gel teñido con azul de Coomassie, donde se observan bandas correspondientes a los pesos moleculares de cada proteína.

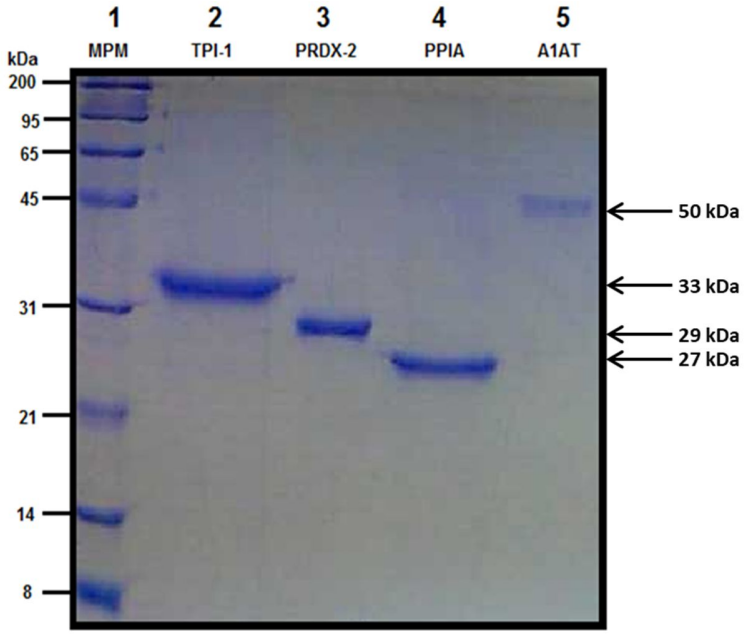


Figura 8. Gel de poliacrilamida al 13% con proteínas recombinantes purificadas.

Para obtener las proteínas de interés (TPI-1, PRDX-2, PPIA y A1AT), se partió de cepas de *E.Coli* BL21 las cuales contenían un inserto para expresar cada proteína por separado. Se lograron expresar de manera adecuada y esto fue comprobado al momento de realizar las inducciones con IPTG ya que se observó una sobreexpresión de la proteína de interés asociada con la intensidad de la banda en un gel de poliacrilamida. La proteína que menos se sobreexpresó y purificó fue A1AT, a pesar de esto logró dar resultados adecuados al momento de evaluarla con los anticuerpos específicos y se observó su presencia en ensayos de western blot y fijación por medio de vacío.

Fijación de proteínas por medio de vacío

Se realizaron ensayos para fijar proteínas mediante vacío utilizando el equipo "Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus" para después evaluarlo con anticuerpo comercial anti-his de ratón. Con base a los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas con el equipo nano-drop se utilizó el stock precipitado con acetona con concentración de 500ng/ml y de ahí se tomaron 40µl de cada uno es decir 20ng de proteína que se resuspendieron en 200µl de agua ultrapura, para poder observar un revelado intenso en todas las proteínas.

Principalmente la mayor ventaja de utilizar esta manera de fijar las proteínas fue la facilidad con la que se podía utilizar este equipo ya que se requieren pocos pasos a seguir y el tiempo para realizar el ensayo es corto, en comparación con otros métodos evaluados previamente en nuestro laboratorio. Con el uso del equipo "Bio-Dot XYZ3060 Dispense Platform" se puede decir que tenía la desventaja de que se utilizaron cantidades de proteína en nanolitros y no en microlitros. En cuanto al western blot si se observó que en este caso era menor cantidad de proteína la que se utilizó para realizar una membrana a partir de un gel preparativo y además la manera del manejo de las muestras es más complejo ya que en el equipo ("Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus") solamente se agregaban las muestras por encima de la membrana de nitrocelulosa.

Cuantificación de proteínas con equipo "NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer"

Se realizaron diferentes diluciones de cada stock de proteínas con el fin de obtener concentraciones finales de 250ng/ml, 500ng/ml y 750ng/ml para después fijar cada una por medio del vacío y observar la intensidad de revelado de cada concentración. En la figura 9 se observa el revelado de las proteínas recombinantes con las diferentes concentraciones de cada proteína y el control positivo (Trastuzumab).

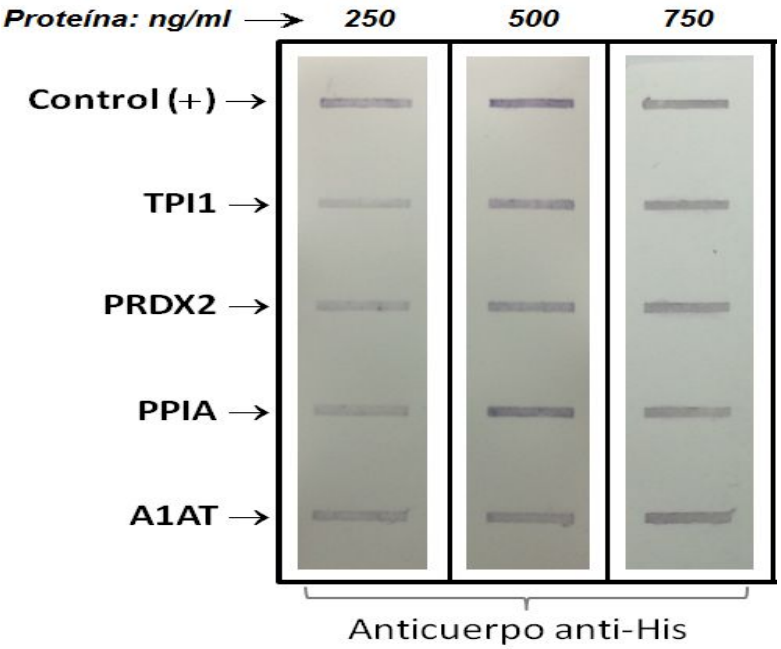


Figura 9. Fijación de proteínas a diferentes concentraciones mediante el uso del equipo "NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer".

La cuantificación de proteínas se realizó con el objetivo de tener más control sobre la cantidad de proteína que se utilizaría para obtener un buen revelado en la membrana de nitrocelulosa, para esto, se tomó como referencia 250ng/ml, 150ng más que la concentración de 100ng/ml que utilizaron Liu y colaboradores en el 2008 *(17)* al realizar un miniarreglo para detectar cáncer de colon, después se decidió hacer diluciones para obtener concentraciones de 500ng/ml y 750ng/ml y compararlas todas. Se observó mayor intensidad de revelado tanto en 500 como en 750ng/ml por lo que se decidió utilizar los stock a una concentración de 500ng/ml para observar un buen revelado en las membranas.

Precipitación de proteínas

El método de precipitación de proteínas con acetona resultó adecuado ya que logró remover gran cantidad de coomassie de las proteínas electroeluídas y además fue de fácil manejo debido a que se resuspendía bien el precipitado de proteínas. Con aproximadamente 12µl de proteína se lograba formar un gran precipitado. Una pequeña desventaja de este método, era que también precipitaban algunas sales presentes en el stock electroeluído, sin embargo, no causaba alguna interferencia en el resultado final.

En algún momento se decidió utilizar otro método de precipitación de proteínas con TCA, que es muy mencionado en la literatura como un mejor agente precipitante. Sin embargo, al utilizarlo se observó poco precipitado y al momento de centrifugar y desechar el sobrenadante no se obtuvo precipitado alguno. Cuando se evaluó en geles de poliacrilamida no hubo presencia de bandas correspondientes a cada proteína, razón por la cual se dejó de utilizar este método dejando solamente la acetona como agente precipitante ideal para las cuatro proteínas utilizadas.

Tal como varios autores reportan en estudios previos con la elaboración de miniarreglos para el diagnóstico de cáncer *(17, 18, 19, 20)*, no es suficiente un solo biomarcador como AAT para poder obtener un diagnóstico adecuado, al momento de utilizar distintos biomarcadores la prueba alcanzaría un aumento considerable en cuanto a especificidad y sensibilidad en un diagnóstico de alguna enfermedad, en este caso cáncer de mama. Dentro del presente trabajo se dio el primer paso para poder construir una prueba de diagnóstico con la utilización de distintos biomarcadores específicos, el siguiente paso es la evaluación de estas membranas con proteínas recombinantes fijadas para detectar autoanticuerpos en sueros de pacientes con cáncer de mama.

CONCLUSIONES

Las proteínas TPI-1, PRDX-2 y PPIA se lograron expresar y purificar obteniendo grandes rendimientos para posteriormente ser fijadas sobre membranas de nitrocelulosa por medio de vacío; la proteína A1AT se logró expresar pero para purificarla presenta más problemas en comparación con las antes mencionadas, razón por la cual es necesario emplear otro método distinto para su purificación. Con los ensayos de western blot se logró validar que efectivamente eran las proteínas recombinantes las que fueron purificadas, debido a que revelaron adecuadamente a la altura de sus respectivos pesos moleculares con los anticuerpos comerciales que reconocen estas proteínas. Se necesita un stock de proteína purificada y electroeluída a concentración de 500 ng/ml para poder observar un revelado intenso en las membranas de nitrocelulosa, se logró utilizando el método de fijación por medio de vacío con el equipo "Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus". Estos datos preliminares pueden llegar a utilizarse para funcionar como una prueba de tamizaje para la detección oportuna del cáncer de mama.

REFERENCIAS

[1] Altintas Z, Tothill IE, "Molecular biosensors: promising new tools for early detection of cancer". Nanobiosensors in disease diagnosis. vol. 4, pp. 41-10, 2015.

[2] Breastcancer [Internet]. [Updated 28 Mar 2014]. 7 East Lancaster Avenue, 3rd Floor Ardmore, PA 19003. Disponible en: http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estadios

[3] Global Cancer Statistics [Internet]. [updated 14 May 2014]. Fact Sheets Population. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

[4] Boletín epidemiológico [Internet]. [updated 28 Mar 2014]. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Unico de Información. Disponible en: www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/.../edit2613.pdf

[5] Chavarri Y, Villarreal C et al, "Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system". The lancet Oncology. Vol. 13, no. 8. pp. e335-343, 2012.

[6] Secretaría de Salud, "Cáncer de mama, un reto de todos" Publicación México Sano, México, D.F., año 4, número 26 [Internet]. [Updated 28 Abr 2011]. Disponible en: http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/period_mexsano/MSN26.pdf

[7] Brooks M, "Breast Cancer Screening and Biomarkers". Vol. 472, no. 13. pp. 307-321, 2009.

[8] Harris L, Fritsche H et al, "American Society of Clinical Oncology update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer". Journal Clinical Oncology. Vol. 25, no. 33. pp. 5287–5312, 2007.

[9] Pereira SR, Kuick R et al. Identification of 14-3-3 q as an antigen that induces a humoral response in lung cancer. Cancer Research. Vol. 67. pp. 12000-12006. 2007.

[10] Yi JK, Chang JW et al, "Autoantibody to Tumor Antigen, Alpha 2-HS Glycoprotein: A Novel 2 Biomarker of Breast Cancer Screening and Diagnosis". Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention. Vol. 18, no. 5. pp. 1357-64. 2009.

[11] Tamesa MS, Kuramitsu Y et al, "Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis". Electrophoresis Journal. vol. 30, no. 12. pp. 2168–2181. 2009.

[12] Desmetz C, Bascoul C et. al, "Identification of a New Panel of Serum Autoantibodies Associated with the Presence of In situ Carcinoma of the Breast in YoungerWomen". Clinical Cancer Research. vol. 15, no. 14. pp. 4733-4741. 2009.

[13] Lopez E, Aguilar A et al, "Alpha 1-antitrypsin: A novel tumor-associated antigen identified in patients with early-stage breast cancer". Electrophoresis Journal. vol. 33, no. 14. pp. 2130-2137. 2012.

[14] Wewers MD, Casolaro MA et al, "Comparison of alpha-1 antitrypsin levels and anti-neutrophil elastase capacity of blood and lung in an individual with the alpha 1-antitrypsin phenotype null-null before and during alpha 1-antitrypsin augmentation therapy". American Review of Respiratory Disease. vol. 135, no. 1. pp. 539-543. 1987.

[15] Hultschig C, Kreutzberger J et al, "Recent advances of protein microarrays". Current Opinion Chemistry Biology. vol. 10, no. 1. pp. 4-10. 2006.

[16] Miller MB and Tang YW, "Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology". Clinical microbiology reviews. vol. 22, No. 4. pp. 611–633. 2009.

[17] Liu W, Wang P et al, "Evaluation of Tumour-Associated Antigen (TAA) Miniarray in Immunodiagnosis of Colon Cancer". Scandinavian Journal of Immunology. vol. 69, no. 1. pp. 57–63. 2009.

[18] Qin JJ, Wang XR et al, "Mini-array of multiple tumor-associated antigens (TAAs) in the immunodiagnosis of esophageal cáncer". Asian Pag J Cancer Prev. vol. 15, no. 6. pp. 2635-2640. 2014.

[19] Wang P, Song C et al, "Evaluation of Diagnostic Value in Using a Panel of Multiple Tumor-Associated Antigens for Immunodiagnosis of Cancer". Journal of Immunology Research. vol. 2014. pp. 1-7. 2014.

[20] Liu W, De la Torre I et al, "Detection of autoantibodies to multiple tumor-asociated antigens (TAAs) in the immunodiagnosis of breast cancer". Tumor Biology. vol. 2015, no. 36. pp. 1307-1312. 2014.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

EXTRACCIÓN DE MUCILAGO DE CHÍA (*Salvia hispánica L.*) POR MEDIO DE SONICACIÓN.

Salazar-Bautista, E., Cruz-Moran, Y.J., y *Luna-Suárez, S.

Centro de investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México.

*Autor para correspondencia: silvials2004@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La chía (*Salvia hispánica L.*) posee un gran valor nutrimental. Su semilla es rica en proteínas (15–25%), carbohidratos (26–41%), ácidos grasos (30–33%), antioxidantes y fibra. Cuando la semilla entra en contacto con el agua, el mucílago emerge inmediatamente y en un corto periodo se forma una "cápsula mucilaginosa" que rodea la semilla, el cual debido a sus propiedades es utilizado como ingrediente funcional en la industria alimentaria. Sin embargo, su uso se ha limitado, debido a que el proceso de extracción tradicional, requiere de etapas repetidas de hidratación, secado y tamizado, necesitando más de 48 hrs en el proceso. El presente trabajo plantea un método rápido de separación del mucilago, la propuesta involucra una sola hidratación, calentamiento, ajuste de pH, sonicación y centrifugación. La eficiencia de la separación del mucilago se determinó mediante la capacidad de retención de agua de la semilla. El porcentaje de extracción obtenido bajo esta metodología fue del 80%, un valor superior a lo reportado en la literatura, esto en solo 5 horas, siendo un método rápido en comparación con el método tradicional, abriendo la posibilidad del uso a gran escala de este método para la extracción y uso de mucilago de chía.

Palabras clave: Chía; mucílago; sonicación

INTRODUCCIÓN

El género *Salvia* pertenece al Reino Plantae, división como plantas vasculares y familia Lamiaceae. La planta es conocida como "chia" (*Salvia hispanica L.*) que es una hierba anual que puede crecer hasta 1 m de altura y tiene hojas dispuestas de forma opuesta con pequeñas flores hermafroditas blancas o púrpuras (3 a 4 mm). Las semillas son ovales, lisas y brillantes, y su color varía de negro, gris y negro moteado a blanco; el tamaño oscila entre 1 mm y 2 mm [1][2][3]. En el año 2014 México cosechó 40000 toneladas de esta semilla. La composición proximal de la chía es 26 - 41% de carbohidratos, 25 - 40% de grasa y 15 - 24% de proteína [1].

El mucílago de las semillas de chía es un polisacárido de alto peso molecular [4], se encuentra en las tres capas exteriores de la cubierta de la semilla. Cuando la semilla entra en contacto con el agua, el mucílago emerge inmediatamente y en un corto periodo se forma una "cápsula mucilaginosa" transparente que rodea la semilla [5]. Las unidades estructurales que componen el mucílago de la semilla de chía, fueron descritas como un tetrasacárido con una cadena principal compuesta por unidades de β -(1→4)-D-xilopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-Dxilopiranosil con ramificaciones de 4-O-metil-α-D-ácido glucurónico en la posición O- 2 de β-D xilopiranosil de la cadena

principal. La relación de los monosacáridos Dxilosa,-D-glucosa y ácido 4-O-metil-□-D-ácido glucurónico es de 2:1:1[4]. En general, los biohidrogeles como el mucilago son polisacáridos tridimensionales que retienen más del 90% de agua [6], los biohidrogeles tienen propiedades específicas con una alta capacidad de retención de agua, la viscosidad y la capacidad de someterse a la expansión volumétrica y la contracción, por lo tanto, los hidrocoloides se utilizan comúnmente como fibras dietéticas, espesantes, gelificantes, emulsionantes, estabilizadores, sustitutivos de grasas, agentes clarificantes, agentes floculantes, agentes turbantes y agentes de batido. Adicionalmente, los hidrocoloides tienen aplicaciones en las áreas de películas comestibles, encapsulación de sabores e inhibición de la cristalización [7].

Una tecnología emergente que puede ser usada para la extracción de mucilagos es el ultrasonido, que aplica ondas sonoras con frecuencias por encima de la capacidad auditiva humana o energía generada por ondas sonoras de frecuencias rango de 18 kHz a 1 GHz. El ultrasonido crea cavitación en la solución, dando por resultado la formación de numerosas burbujas del vapor de agua que se dilatan y se contraen rápidamente, dando por resultado también la temperatura rápida y altamente aumentada y la presión [8]. Otras fuerzas relacionadas con ultrasonidos incluyen vibración, agitación física y generación de radicales a partir del fluido de sonicación [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de paramentos

Se plantearon cuatro tratamientos los cuales se presentan en la tabla 1. Tomados del trabajo de Muñoz [5], en cuyo trabajo encontró que esas eran las mejores condiciones para la extracción de mucilago de semilla de chía; además se utilizó sonicación. para esto se usó de ultrasonido provisto por el sonicador Omni Soni Ruptor 400, aplicando 200 W de potencia y 12 kHz en frecuencia de onda.
Para realizar estos tratamientos, se usaron 0.2 g de semilla.

Tabla1. Tratamientos planteados para la extracción de mucílago de chía.

Tx	Hidratación 1:20	pH 8	80°C	Sonicación 3 ciclos de 3 min
1	X			
2	X	X		
3	X	X	X	
4	X	X	X	X

Una vez realizados los tratamientos la muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos y se secaron en horno a 60° para posteriormente determinar la capacidad de retención de agua (CRA).

Capacidad de retención de agua (CRA)

A las semillas una vez secas se les midió la capacidad de retener agua, esto se hizo agregándoles un exceso de agua destilada (10 ml), y dejando hidratar durante 24 horas, una vez finalizado este lapso las muestras fueron centrifugadas. Posteriormente se pesó la pastilla y los resultados se expresaron en g de agua retenida/ g de semilla. Se midió la capacidad de retención de agua de las semillas como un método indirecto para conocer la eficacia de los tratamientos, esto se realizó debido a que la cantidad de agua retenida por las semillas está relacionada directamente con la cantidad de mucílago presente en la semilla.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de paramentos

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1 presentada a continuación, donde se muestra el impacto de cada tratamiento sobre la CRA de la semilla.

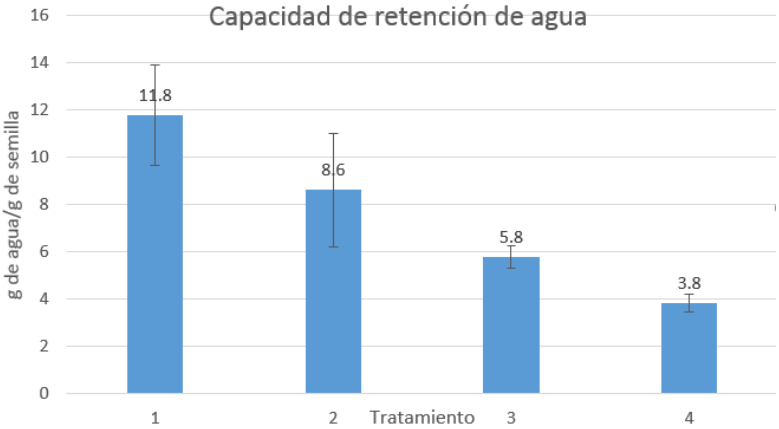


Figura 1. Capacidad de retención de agua de las semillas tratadas.

La primera barra corresponde a la semilla solamente hidratada en relación 1:20, la segunda hidratación y pH ajustado a 8, la tercera además de las condiciones antes mencionadas incluye el calentamiento durante 30 minutos y la última barra corresponde al tratamiento con las condiciones previamente descritas y 3 ciclos de sonicación durante tres minutos. Como se puede observar el mejor desempeño para la eliminación de mucílago lo presenta el tratamiento 4 que muestra la disminución de retención de agua en un 67.5% en comparación con el tratamiento 1 que es el blanco.

Las condiciones probadas fueron propuestas debido a que Muñoz [5] encontró que una temperatura de extracción de 80 ° C, pH 8,0 y relación de hidratación de 1:40 (semilla de chía: 38 de agua) tenía un rendimiento de extracción de 5 a 7 g / 100 g. y se implementó la sonicación ya que es una tecnología emergente que se ha usado para la extracción de otros mucílagos como el de *Malvaviscus penduliflorus* y de *Hyptis suaveolens,* como se dio a conocer en los trabajos realizados por Gallardo [10] y Jiménez [11] respectivamente. Se hidrató la semilla en relación 1:20 durante 2 horas ya que Muñoz reporto que la semilla absorbe hasta 20 veces su peso en agua y a partir de las 2 horas permanece constante, el pH ayuda a la solubilización del mucílago al igual que la temperatura además de que esta ayuda a la desestabilización del mucílago, fenómeno que es complementado con la sonicación la cual produce cavitación que implica el estallamiento de microburbujas liberando una gran cantidad de energía.

CONCLUSIONES

La sonicación es una tecnología emergente la cual tiene diversos usos, en este trabajo se exploró su utilización para la extracción de mucilago de chía, lográndose un tratamiento efectivo en conjunto con las condiciones de pH básico, temperatura de 80°C, siendo un método rápido en comparación con el método tradicional, abriendo la posibilidad del uso a gran escala de este método para la extracción y uso de mucilago de chía, así como de la semilla desmucilaginada.

REFERENCIAS

[1]. R. Ayerza y W.Coates, «Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat ». Nutrition Research 25:995-1003, 2005.

[2]. Y. Lu Y L. Y. Foo, «Polyphenolics of *Salvia* A review». Phytochemistry, 59, 117140, 2002.

[3]. N. Mohd Ali, S. K. Yeap, W.Y. Ho, B. K. Beh, S. W Tan, y S. G. Tan, «The promising future of chia, *Salvia* hispanica L». Bio Med Research International, 9. 2012.

[4]. K.Y. Lin, J. R. Daniel y R. L. Whistler «"Structure of chia seed polysaccharide exudate." » Carbohydrate Polymers 23(1): 13-18,1994.

[5]. L. A. Muñoz, A. Cobos, O. Diaz, J. M. Aguilera, «Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. J Food Eng, 108: 216–224, 2012.

[6]. K.S. Kazanskii, S.A. Dubrovskii, « Polyelectrolytes Hydrogels Chromatogr. Mater»., Springer Berlin Heidelberg, pp. 97–133, 1992.

[7]. C. Viebke, S. Al-Assaf, G. O. Phillips, «Food hydrocolloids and health claims». Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre 4 (2), 101e114, 2014.

[8]. K.S. Suslick, M.M. Fang, T. Hyeon, M.M. Mdleleni, «Applications of sonochemistry to materials synthesis», Sonochemistry and Sonoluminescence, Kluwer Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 291–320, 1999.

[9]. J. Chandrapala, C.M. Oliver, S. Kentish, M. Ashokkumar, «Use of power ultrasound to improve extraction and modify phase transitions in food processing», Food Rev, 2013.

[10]. C. Gallardo Cabrera, J. D. Pazmiño Arteaga, y E. Benavides, «Extracción y caracterización reológica del mucílago de Malvaviscus penduliflorus (San Joaquín)». Revista Cubana de Plantas Medicinales, 18(4), 567-574, 2013.

[11]. A. N. Jiménez Flores, B. N. Gómez Luna, J. C. Ramírez Granados, B. E. García Mier, A. Martínez Rios, R. A. Torres Lopez, M. L. Ruiz Aguilar y R. A. Veloz García, «Efecto del ultrasonido y la agitación mecánica en la extracción del mucilago de las semillas de Hyptis suaveolens» en en el XII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, 2015.

PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD ÁCIDA DE LA AMARANTINA (GLOBULINA 11S).

Cruz-Morán, Y.J., *Luna-Suarez, S.

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN), Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac – Tepetitla Km. 1.5, Tlaxcala, C.P. 90700.

*Autor para correspondencia: silvials2004@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El presente trabajo abordó el estudio relacionado con la purificación de subunidad ácida de la globulina 11S de amaranto (AAC). Para lo cual se utilizó la metodología de cromatografía de afinidad por inmovilización con metales (IMAC) con Ni^{2+} 0.1M como agente quelante de His-tag presentes en la AAC; también se empleó SiO_2 (tierra de diatomeas) como medio de retención del Ni^{2+} y de las proteínas. Primeramente se partió de la cepa de recombinante de *E.coli* BL21 DE3 codon plus RIL, la cual produce de manera intracelular AAC y por lo cual se extrajo mediante lisis celular con ayuda de sonicación. En la extracción se obtuvieron dos fracciones, denominadas soluble e insoluble, de las cuales la insoluble contenía AAC por lo que esta fracción se trató para realizar la purificación. Para la elución de la proteína se utilizaron soluciones de NaCl 1M, urea 6 y 8M e imidazol 125, 250 y 500mM; encontrando que AAC eluyó mayoritariamente con NaCl 1M, y urea 6 y 8M. Habiendo logrado purificar aproximadamente 1.845mg de proteína, partiendo de una muestra inicial de 0.12g.

Palabras clave: Globulina 11S; AAC; *E.coli;* IMAC; His-tag.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de amaranto son caracterizadas por ser de buena calidad nutrimental, ya que presentan un buen balance en cuanto a contenido de amino ácidos, de los cuales algunos de ellos son esenciales. La globulina 11S (conocida como amarantina) es la proteína de reserva que mayor abundancia tiene en el grano de amaranto; dicho polipéptido es extraído con buffer salino a pH neutral [1]. Estructuralmente la globulina 11S es un hexámero formado por dos proglobulinas (trímeros) que son trasportadas a la vacuola donde se unen por una endopeptidasa de Asn-Gly favoreciendo así la asociación de los trímeros [2]. Por otra parte se ha reporta que dicho hexámero tiene una masa molecular de entre 300 y 360 KDa, además de que las subunidades tienen una masa molecular de 50 a 70 KDa, cada una de las cuales está conformada por un polipéptido ácido de aproximadamente 30 KDa y uno básico de alrededor de 20 KDa. Estos polipéptidos se encuentran unidos por un enlace desulfuro [3].

Por otro lado, Morales-Camacho y col. han realizado trabajos para la expresión del polipéptido ácido de la amarantina (AAC) en *E. coli* [4] ya que se conoce que es importante debido a su valor nutricional en cuanto a contenido y balance de aminoácidos esenciales; por esta razón dicha proteína ha sido considerada como buena candidata para modificar estructuralmente [5] con la inserción de biopeptidos, tales como los de valina-tirosina (VY), los cuales presentan actividad antihipertensiva [6] por su

capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), la cual sintetiza la hormona angiotensina II, quien desencadena un aumento de la presión arterial [7].

Respecto a las proteínas modificadas genéticamente que suelen expresarse en diferentes organismos, tal como lo es el caso de *E.coli* se han aplicado algunas técnicas que facilitan la purificación de estas; tal es el caso de las etiquetas de histidina o His-tagged, las cuales se agregan en la modificación de las proteínas [5] y se pueden insertar de 1 a 9 residuos de histidina ya sea en el grupo C o N terminal de la proteína [8]. A través de las His-tag se suelen inmovilizar las proteínas por metales pesados con características quelantes, tales como Zn^{2+}, Cu^{2+} y Ni^{2+}. Por ello esta técnica de purificación es conocida como cromatografía de afinidad por inmovilización con metales (IMAC) [9].

Por lo tanto, con base a los antecedentes y trabajos mencionados, el objetivo del presente trabajo consiste en purificar la proteína AAC con His-tag, expresada en *E.coli* mediante el uso de IMAC y Ni^{2+} como metal quelante, inmerso en una matriz de SiO_2; con la finalidad de poder realizar caracterización estructural de las proteínas mediante técnicas espectroscópicas (en trabajos posteriores).

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de la proteína AAC

La producción de la subunidad ácida de la amarantina con His-tag se realizó por fermentación en biorreactor utilizando la cepa *E.coli* BL21 DE3 codon plus RIL [4]. Para ello se realizó un pre inoculo de la cepa en 5mL de medio LB e incubado durante 6 h a 37°C. Posteriormente se realizó un inóculo final al 2.5% de volumen de medio de cultivo incubado a 37°C por 12 h y 250rpm [10].

Extracción de la proteína AAC

Una vez obtenida la biomasa, se realizó la extracción de la proteína AAC mediante lisis celular. Debido a que la proteína no es excretada al medio de cultivo, por ello se realizó ruptura celular de *E.coli.* Previo a la lisis celular se realizó un lavado de las células utilizando un buffer de fosfatos (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) 20mM, pH 7.5, en presencia de NaCl 0.2M. En seguida se centrifugó a 13,000 rpm durante 3min y se separó el sobrenadante de las células.

Realizado el lavado de las células, se procedió a realizar la lisis celular, en el buffer de extracción. Posteriormente la ruptura celular se realizó mediante ultrasonido a una potencia de 160W utilizando un sonicador Omni Sonic Ruptor 400 (punta OR-T-156) con 5 ciclos de 1 min. de sonicación por 1 min. de enfriado en hielo [10]. Seguidamente se centrifugó, en este caso se separó el sobrenadante del sedimentado; dicha fracción se nombró como fracción soluble.

Posteriormente se obtuvo la fracción insoluble, en la que se agregaron 7 veces el peso (g) del sedimento de solución (mL) de urea 6M en presencia de NaCl 0.2M y fosfatos 20mM después se colocó en agitación durante 2h en agitador orbital. En seguida se centrifugó la muestra siguiendo las condiciones mencionadas anteriormente; del sobrenadante obtenido (fracción insoluble) fue el que se trató para purificar la proteína AAC, ya que en éste es donde se encontraba la proteína recombinante.

Purificación de AAC mediante IMAC

Para el proceso de purificación se la proteína se empleó el método de IMAC, utilizando $NiSO_4$ 0.1M en una matriz de SiO_2. Para ello primeramente se realizó el empacado de la columna de cromatografía de

un volumen de 10mL; primeramente se hizo pasar agua destilada por la columna para facilitar el empacado del SiO_2. Posteriormente se reguló el flujo de elución a 1mL/min con ayuda de una bomba peristáltica. En seguida se agregó la solución de $NiSO_4$ a la fase estacionaria y se hizo recircular. Realizado esto, se hizo pasar por la columna buffer de fosfatos 20mM, pH 7.5 en presencia de NaCl 0.2M. De manera subsiguiente se agregó la fracción insoluble a la columna acompañada del buffer de fosfatos con NaCl. Esto se hizo con la finalidad de permitir que la proteína AAC se uniera al Ni^{2+} mediante las His-tag y así pudiera retenerse en la fase estacionaria.

Posteriormente se realizaron tres lavados de la fase estacionaria con buffer de fosfatos, 20mM a pH 7.5 (40mL) y buffer de fosfatos, 20mM, pH 7.5 con NaCl 0.2M (20mL). A continuación se agregaron soluciones de NaCl 1M (10mL), urea 6M (5mL), urea 8M (5mL), imidazol 125mM (5mL), imidazol 250mM (5mL) e imidazol 500mM (5mL) (cada una de estas en presencia de buffer de fostafos 20mM); así mismo las soluciones eluídas se recolectaron en fracciones de 1mL. Por último se hicieron pasar 20mL de agua desionizada en la columna. Posteriormente las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12% de acrilamida.

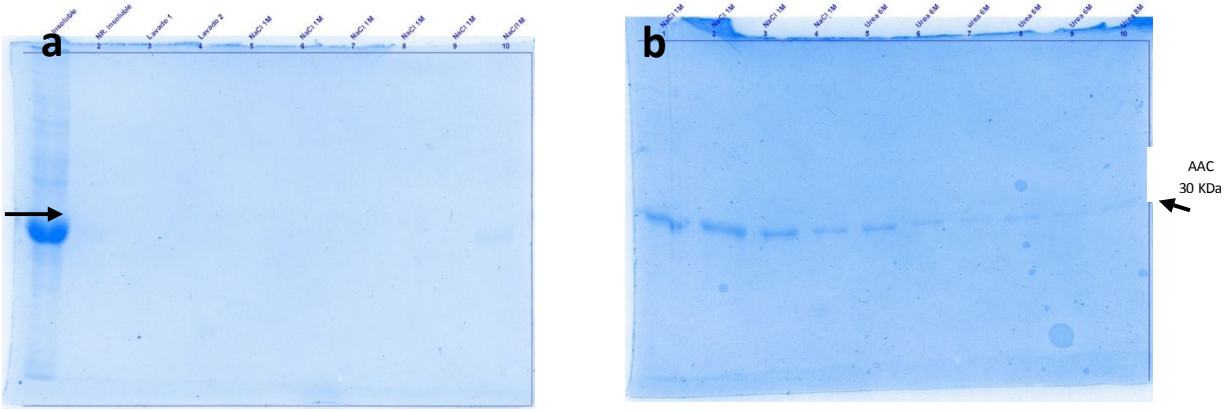
Cuantificación de proteína purificada

La cuantificación de proteína AAC purificada se realizó por triplicado utilizando la técnica de Bradford.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis por SDS-PAGE de las muestras obtenidas

Una vez colectadas las fracciones de la purificación de AAC, cada una de estas se analizaron por SDS-PAGE. Los geles se muestran a continuación.



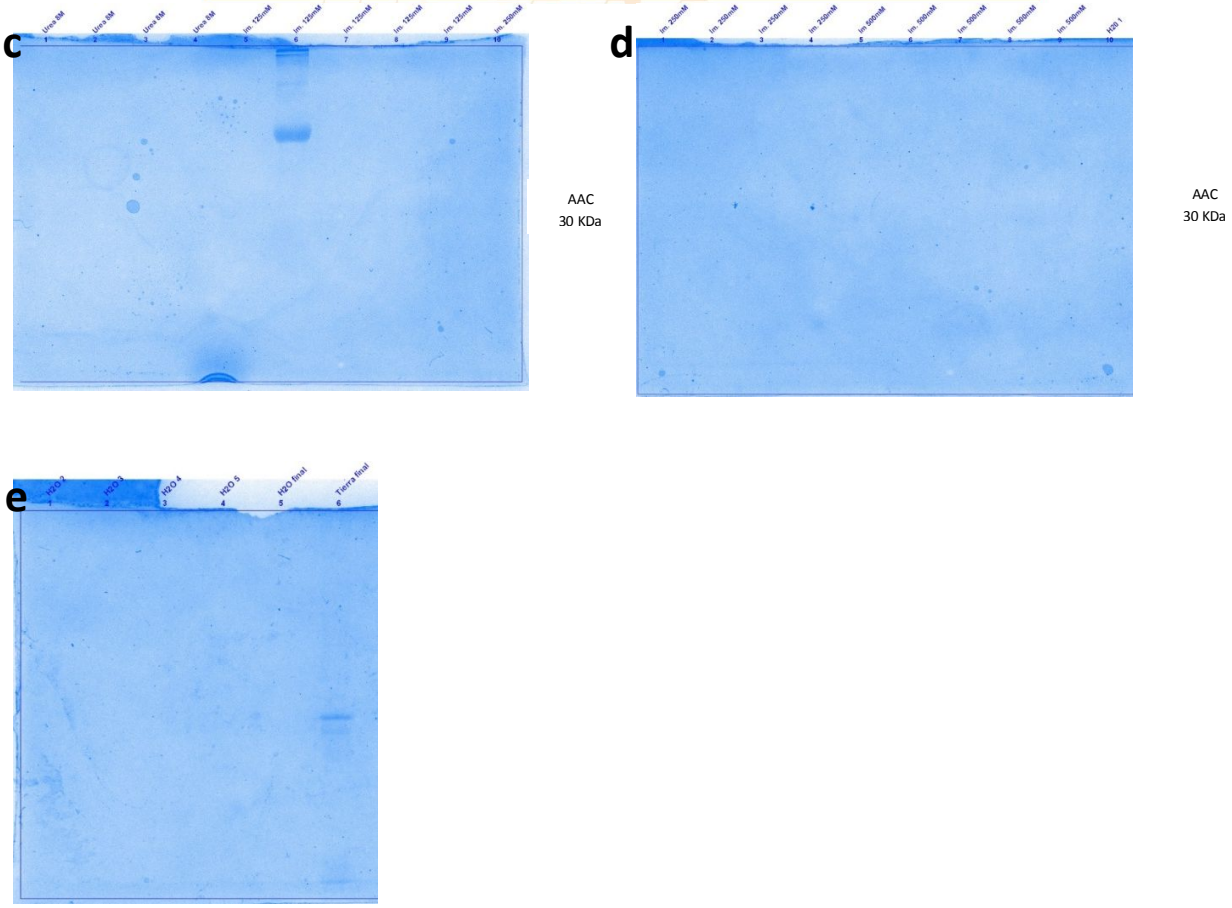


Figura 1. Monitoreo de elución y purificación de proteína AAC con diferentes buffers de extracción. (a) Correspondiente a las muestras de fracción insoluble, no retenida, lavado 1, 2 y primeras seis fracciones de NaCl 1M; (b) fracciones de NaCl 1M, de urea 6M y primera fracción de urea 8M; (c) fracciones de urea 8M, imidazol 125mM y primera fracción de imidazol 250mM; (d) fracciones de imidazol 250 y 500mM; (e) fracciones de agua y muestra de la fase estacionaria después de la purificación.

En el caso del gel (a) se muestra la fracción insoluble, en la que se observa la presencia la proteína AAC con un peso molecular de aproximadamente 30KDa. En seguida se colocaron las fracciones eluídas de lo no retenido (N.R.), lavados 1 y 2, en los cuales no se observó la presencia de alguna proteína, lo que quiere decir que la muestra de fracción insoluble colocada en la tierra de diatomeas se quedó retenida en ésta; además que en los lavados 1 y 2 no lograron eluír proteínas retenidas en la fase estacionaria. Por otra parte se observa que en las fracciones uno a la cuatro de buffer de fosfatos 20mM con NaCl 1M no eluyó proteína; sin embargo en la fracción cinco se ve la presencia de AAC.

Respecto al gel (b) se observa que la proteína AAC continuó eluyendo en las fracciónes seis a la diez del mismo buffer de fosfatos 20mM con NaCl 1M. En los siguientes carriles del mismo gel se puede observar que todas las cinco fracciones de urea 6M continuó eluyendo AAC, mientras que en el caso de las correspondientes a urea 8M solo se observó presencia de esta en la primera fracción. Sin embargo en

las fracciones dos a la cinco de esta misma solución (gel (c)), no se ve la presencia de AAC. Lo que quiere decir que la solución de urea 6M fue suficiente para permitir la elución de la proteína.

En caso de los geles (c) y (d) se colocaron muestras de las fracciones obtenidas de imidazol, sin embargo no se observó elución de la proteína AAC en presencia de estas soluciones. Lo que implica que se logró eluír con las soluciones de NaCl 1M y urea 6 y 8M. Sin embargo en la fracción dos, de imidazol 125mM (del gel (c)) se observó la presencia de proteínas distintas a AAC y con pesos moleculares superiores a esta; ello implica que dicha proteína posiblemente se encuentre adherida a AAC mediante puentes de hidrogeno o alguna otra interacción molecular. Respecto al gel (d), no se observó presencia alguna de AAC en ninguna de las muestras analizadas (fracciones de imidazol 250, 500mM y fracción uno de agua). Por último, en el gel (e) se analizaron las fracciones restantes de agua y una muestra de la fase estacionaria utilizada en la purificación. En dicho gel no se observó presencia de AAC en las fracciones de agua, pero no así en el caso de la muestra de fase estacionaria, ya que de manera clara se observa que aún hay proteína retenida en la matriz, tanto AAC como proteínas contaminantes de mayor y menor peso molecular a la subunidad ácida de la amarantina. Respecto a esto en trabajos realizados por Flores-Lima en 2017, reporta que resulta difícil remover el total de AAC absorbida en la matriz de SiO_2.

Cromatograma de purificación de AAC

En la figura 2 se muestra el cromatograma que describe el comportamiento de elución de la proteína. En el cual se puede observar de manera clara que la proteína comenzó a eluír a partir del mililitro 4 hasta (NaCl 1M, fracción 4) y terminó en el mililitro 27 (Im. 250mM, fracción 2). De todas las fracciones analizadas, la mayor concentración de proteína eluída se presentó en la fracción 7 de NaCl 1M. Por otra parte se logró eluír un total de 1.845mg de proteína, obteniéndose un rendimiento del 1.537%, tomando como base la cantidad de proteína obtenida en las fracciones y el peso de muestra (biomasa) que se utilizó para realizar la extracción y purificación de proteína AAC (la cual fue de 0.12g).

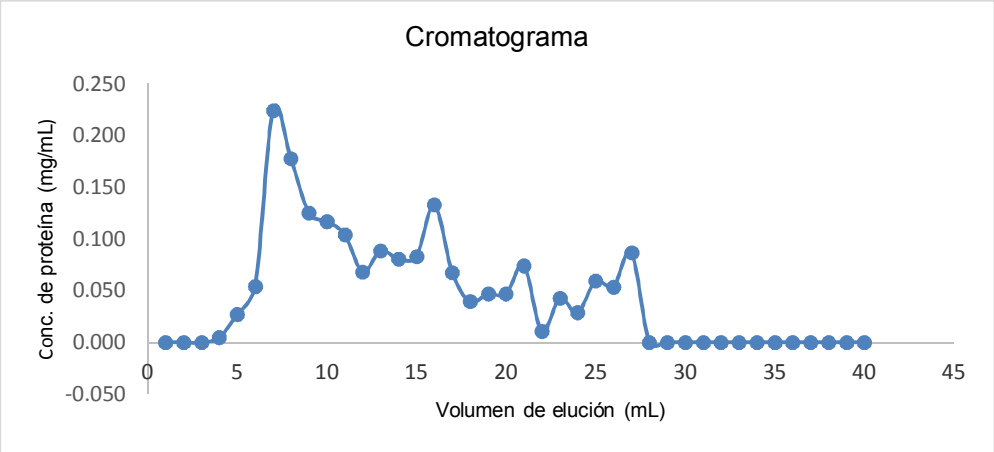


Figura 2. Cromatograma de elución de proteína obtenida en las diferentes fracciones.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados mostrados, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se purificó la proteína AAC (en aproximadamente un 90% de pureza) utilizando la metodología de IMAC y $NiSO_4$ como agente quelante de las proteínas inmersas a una matriz de SiO_2.
- En análisis de SDS-PAGE mostró la presencia de AAC en las fracciones obtenidas con NaCl 1M, urea 6 y 8M respectivamente.
- Se logró obtener 1.848mg de proteína en las fracciones a partir de 0.12g de muestra de biomasa, logrando así un rendimiento del 1.537%.
- Con base al cromatograma, se pudo observar que la mayor concentración de proteína eluída se logró en el mililitro siete, correspondiente a la fracción obtenida con NaCl.

REFERENCIAS

[1] A. V. Quiroga, E. N. Martínez y M. C. Añón, «Amaranth Globulin Polypeptide Heterogeneity,» Protein Journal , vol. 26, nº 5, pp. 327-333, 2007.

[2] M. R. Tandang-Silvas, C. S. Cabanos, L. D. Carrazco Peña, A. P. Barba de la Rosa, J. A. Osuna-Castro, S. Utsumi, B. Mikami y N. Maruyama, «Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglobulin, from Amaranthus hypochondriacus: Insight into its physico-chemical properties,» Food Chemistry, vol. 135, nº 2, pp. 819-826, 2012.

[3] J. L. Ventureira, «Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificado y soja-amaranto.,» Universidad Nacional de la Plata, La Plata, 2010.

[4] J. I. Morales-Camacho, O. Paredes-López, E. Espinosa-Hernandez, D. A. Fernández Velasco y S. Luna-Suárez, «Expression, purification and thermal stability evaluation of an engineered amaranth protein expressed in Escherichia coli,» Electronic Journal of Biotechnology, vol. 22, pp. 44-51, 2016.

[5] S. Luna-Suarez, S. Medina-Godoy, A. Cruz-Hernandez y O. Paredes-López, «Expression and characterization of the acid subunit from 11S Amaranth seed proteín.,» Biotechnology Journal, vol. 3, nº 2, pp. 209-219, 2008.

[6] M. Ortiz-Martinez, R. Winkler y S. García-Lara, «Preventive and therapeutic potencial of peptides from cereals againts cancer-,» Jorunal of Proteomics, vol. 111, pp. 165-183, 2014.

[7] M. García, P. Puchalska, C. Esteve y M. Marina, «Vegetable foods: Acheapsourceofproteinsandpeptideswith,» Talanta, vol. 106, pp. 328-349, 2013.

[8] A. Roque y C. Lowe, «Affinity Chromatography,» de Chromatography, vol. 421, Journal of Chromatography , 2008, pp. 1-21.

[9] A. S. Pina, C. R. Lowe y A. C. A. Roque, «Challenges and opportunities in the purification of recombinant.,» Biotechnology Advances, vol. 32, pp. 366-381, 2014.

[10] Flores-Lima y I. Jese, «Análisis de las propiedades funcionales de proteínas modificadas de amaranto.,» Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN), Tetetitla de Lardizábal, Tlaxcala, 2017.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO.

[1]González-Ruíz, A.V., [1,2*]Bautista-Rosales, P.U., [2]Palomino-Hermosillo, Y.A., [3]Ramírez-Ramírez, J.C., [1,2]Balois-Morales, R., y [4]Cortes-Cruz, M.A.

1. Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Km. 9 carretera Tepic-Compostela. Xalisco, Nayarit, México. C.P 63180.
2. Centro de Tecnologías de Alimentos, Universidad Autónoma De Nayarit, Ciudad de la Cultura "Amado Nervo", Tepic, Nayarit. México. C.P. 63155.
3. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit, carretera Compostela-Chapalilla, Km. 3.5, Compostela, Nayarit, México. C.P. 63700.
4. Centro Nacional de Recursos Genéticos INIFAP, Blvd. De la Biodiversidad No. 400, Tepatitlán, Jalisco, México. C.P. 47600.

*Autor para correspondencia: u_bautista@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La producción de guanábana (*Annona muricata* L.) y el consumo a nivel nacional se encuentra en aumento; sin embargo, el fruto es susceptible al ataque de patógenos causantes de varias enfermedades, las cuales son un problema de alto impacto económico en México, especialmente en Nayarit. El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar hongos relacionados con patologías en fruto de guanábana. Se recolectaron frutos con signos patológicos, provenientes de huertos de Tecuitata (San Blas), El Tonino (Compostela) y Venustiano Carranza (Tepic). Se realizaron resiembras sucesivas para el aislamiento, la identificación morfológica de hongos se realizó mediante microcultivos de los aislados obtenidos y se determinó el grado de patogenia utilizado los postulados de Koch. La mayoría de los aislados se caracterizaron por presentar micelio color blanco, esponjoso y denso, presentando una variación de blanco a crema, o blanco grisáceo; la morfología en la mayoría de los aislados presentan hifas lineales pigmentadas, algunas septados; algunos presentan conidios pigmentados ovales u ovoides y esporangios esféricos; los hongos que fueron positivos en los postulados de Koch pertenecen a los géneros *Colletotrichum* sp*, Rhizopus* sp*, Lasiodiplodia* sp los cuales están reportados como agentes causales de enfermedades en frutos de guanábana en México; y *Gliocladium* sp reportado en otros países como India, Venezuela y Cuba.

Palabras clave: Guanábana; Patologías; Hongos; Enfermedades; Morfología.

INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de la guanábana (*Annona muricata)* es la actividad de mayor importancia agrícola de las anonáceas [1]. El estado de Nayarit figura como uno de los principales productores de este fruto, SIAP en 2016 reporta una producción total de 17,402 t del fruto, de los cuales le corresponden a Compostela 16,742.80 t, San Blas 477.36 t y Tepic 63.87 t posicionándose como el principal estado productor de México, seguido de Veracruz, Guerrero, Colima, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Chiapas,

Tabasco, Campeche, Yucatán y Morelos. El 85% de la producción nacional de guanábana corresponden a los estados de Nayarit, Colima y Veracruz [2, 3].

El árbol de la guanábana es originario de los países del Caribe, Brasil y México, tiene estrecha relación con la chirimoya, el árbol mide de 3 a 8 metros de altura, en algunas ocasiones alcanza hasta 10 metros; es ramificado, tiene un gran número de ramas secundarias y terciarias, prospera en climas cálidos y húmedos entre 23ºC y 30ºC [4, 5]. El género Annona comprende alrededor de 120 especies de clima tropical y subtropical, de acuerdo al Sistema Integrado de Información Taxonómica (SSIT-CONABIO), actualmente se han aceptado para México 13 géneros y 37 especies de la familia Annonaceae [6].

El fruto es una baya de forma ovoide, puede alcanzar hasta 40 cm de largo con un peso comprendido entre 2 y 4 kilos. La cáscara es de color verde oscuro brillante, que se vuelve verde mate cuando está madura y cubierta de espinas suaves. La pulpa es blanca y jugosa de sabor agridulce, aromático, de color blanco o a veces amarillento. El fruto alberga en su interior semillas de color negro de 2cm de largo [7, 8], El fruto de guanábana se consume en fresco o pulpa procesada en aguas frescas, elaboración de helados, néctar, gelatinas, paletas, licores y mermeladas en el mercado nacional, también tiene importancia económica, por la aplicación medicinal, ornamental, así como en insecticidas biológicos, extracción de esencias, aceites y madera [4].

Un factor limitante en la producción de frutales en México son las plagas y enfermedades; en Nayarit, debido al clima cálido subhúmedo, el fruto de guanábana esta propenso a problemas relacionados con aspectos fitosanitarios, entre ellos el daño producido por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos que han venido limitando su cultivo y comercialización [1], teniendo como resultado un alto impacto económico por las pérdidas que se ocasionan en el rendimiento, aspecto y calidad de la cosecha. En Nayarit el 94% de las pérdidas se asocian a las plagas y enfermedades que atacan al cultivo y el 6% a la maduración del fruto [4]. Una de las principales enfermedades que atacan al fruto del guanábano es la antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, llega a dañar plántulas y plantas adultas atacando tallos, ramas, hojas, flores y frutos [6], también se encuentran reportadas en México: pudrición blanda (*Rhizopus stolonifer* Ehr.), mancha negra de la hoja (*Phyllosticta* sp), mancha del ápice de la hoja (*Pestalotia* sp.), mancha blanca de la hoja (*Macrophoma* sp.), pudrición de fruto (*Fusarium* sp) y mancha morada (*Phytopthora* sp), secamiento de ramas (*Diplodia* sp.) y mancha de las hojas (*Scolecotrichum* sp.) [1, 6, 8, 9].

Las enfermedades en frutos producidas por hongos revelan que la problemática de cada región en su producción y calidad es distinta, tanto en cuestiones de manejo, condiciones de clima y la variedad del fruto; es por esto, que no es posible generalizar sobre la incidencia de una sola enfermedad, por lo cual es indispensable la identificación de patógenos de cada caso. El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar hongos relacionados con patologías en el fruto en Nayarit de las principales zonas productoras de guanábana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de frutos

La colecta de frutos se realizó en el mes de septiembre del 2016, en los huertos localizados en Tecuitata (San Blas), El Tonino (Compostela) y Venustiano Carranza (Tepic) todas pertenecientes al estado de Nayarit, obteniéndose un total de 30 frutos por las tres huertas, se seleccionaron aquellos frutos que

presentaran síntomas con enfermedad, colectándose en bolsas de plástico para ser transportados al laboratorio.

Aislamiento de hongos patógenos

El aislamiento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio, a partir de fracciones de 1 cm^2 de tejido (50% tejido sano y 50% tejido enfermo) parte del epicarpio y mesocarpio. Estos fueron primeramente tratados con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 1% por 2 min. Luego fueron lavados con agua destilada estéril y finalmente se secaron en papel filtro estéril [10]. Las fracciones de tejido se colocaron en placas con medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), se incubaron a 25 °C durante 3-8 días. Una vez obtenidos los aislamientos se realizaron resiembras semanalmente para su purificación, cada colonia se mantuvo en PDA, realizando resiembras cada vez que era necesario.

Identificación de hongos

La caracterización morfológica macroscópica de cada uno de los hongos aislados se realizó *in vitro* por observación del aspecto y color de las colonias aisladas; la morfología microscópica se realizó mediante microcultivos en cajas de Petri con gasa húmeda, varilla de vidrio doblada en "V" y porta objetos estériles, al portaobjetos se adiciono 3 ml de medio PDA y se inoculó el medio dejando incubar de 1-3 días a 28 ºC y, posteriormente para la diferenciación de estructuras se adicionaron gotas de Azul de lactofenol :glicerol (1:1), colocando un cubreobjetos , se observaron las características como micelio, conidióforos y conidias con microscopio óptico con objetivos 10x y 40x utilizando el software Motic Images Plus 2.0; por último, se identificaron a través de las claves taxonómicas y descripciones morfológicas para hongos [10, 11, 12, 13].

Pruebas de patogenicidad

Una vez aislados los hongos de la guanábana, se identificaron las cepas capaces de generar síntomas de enfermedad en el fruto y así se comprobó la capacidad patogénica de los mismos [14].

Se recolectaron frutos en madurez fisiológica, los frutos de guanábana libres de enfermedad se lavaron y desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 3 minutos, se realizaron heridas con punzón para generar cavidades de 1mm de profundidad en zonas del fruto, a las que se les colocó discos de PDA con micelio. El experimento se realizó por triplicado.

Las guanábanas inoculadas se colocaron en cámara de climatización Climacell MMM group, a HR 90% y a 28ºC, se hicieron revisiones diarias para detectar de forma oportuna la aparición de síntomas de enfermedad, se hicieron reaislamientos en cultivo PDA para su identificación y se compararon con los primeros síntomas observados en el aislamiento de hongos patógenos [14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se hace referencia a la morfología de los 30 aislamientos analizados, con la identificación de las especies fungosas de guanábana que presentaron signos de enfermedad.

Gliocladium sp. Las principales características estructurales desarrolladas en medio PDA después de 8 días de crecimiento son, producción de colonias de color blanco a blanco rosáceo o crema, con forma redonda filamentosa, con elevación y anillos concéntricos (figura 1).

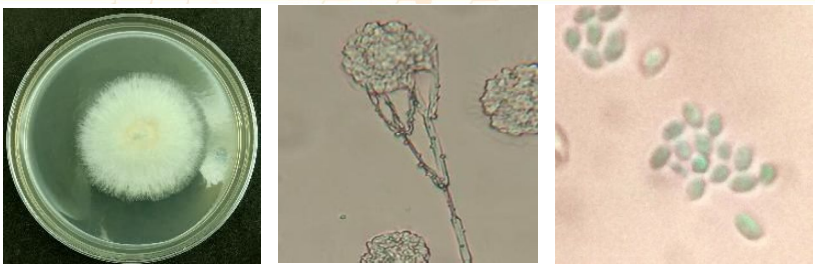


Fig.1 Colonia, cabeza conidial y conidios (40x) de *Gliocadium* sp en medio PDA al octavo día de incubación.

Por otra parte, las hifas son de pared delgada, hialinas, aseptadas algunas rugosas, presenta conidióforos hialinos, ramificados con fiálides en grupos de 3 y septados, los conidios se observan hialinos, redondos en racimos ovalados, de pared delgada, el tamaño oscila entre 3.0-3.8 µm × 2-2.5 µm (largo/ancho). Las características coinciden con las descripciones presentadas [11, 12, 15, 16] de *Gliocladium* sp. causante de la enfermedad conocida como pudrición de fruto, este hongo no se ha reportado en México como patógeno de guanábana, pero si está registrado en india afectando los frutos [8, 17], al igual que en Venezuela y Cuba afectando ramas [18].

Rhizopus sp. El aislamiento se caracterizó por crecimiento micelial rápido, de color blanco, redondo algodonosa y filamentosa, presenta hifas aseptadas, pigmentadas, se observaron esporangióforos lisos, aseptados, pigmentados de pared gruesa. Los esporangios, son esféricos visibles, pigmentados, globosos; las esporangiosporas presentaron diversas formas alargadas, ovaladas y redondas, y pigmentadas, ver figura 2. Lo descrito con anterioridad coincide con las características típicas de *Rhizopus* sp [10, 11, 12, 13, 19, 20]. En México se tiene clasificado al *Rhizopus* sp. como causante de pudrición blanda en anonáceas, es una enfermedad de considerable importancia, dado que ataca a frutos próximo a la cosecha y posterior a ésta, ocasionando el 50% de pérdidas más en México [6, 21], asimismo se tienen registros en Brasil, Cuba, Venezuela, entre otros [8, 18].

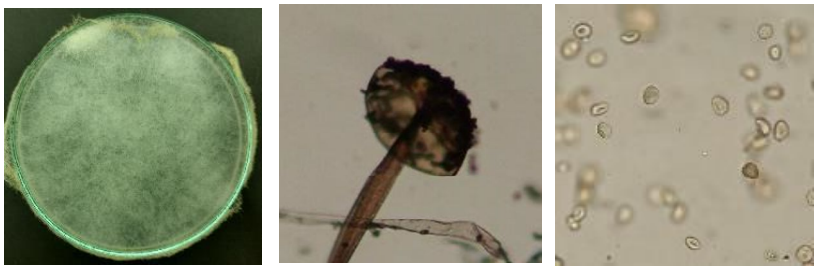


Fig. 2. Colonia de *Rhizopus* sp, membrana de esporangio rota (40x), esporangiosporas pigmentadas.

Lasiodiplodia sp. Se observaron colonias blancas a grisáceo, redonda algodonosa filamentosa con elevación y vellos en los bordes. Las hifas son septadas, pigmentadas de pared gruesa. Los conidióforos hialinos, simples, algunos septados y los conidios son sub-ovoides a elipsoidales, pared gruesa, al inicio hialinos y ya maduros pigmentados, rugosos con un septo, el tamaño oscila de 26.5 x 15 µm aprox. (largo/ancho). Las características morfológicas coinciden con el hongo *Lasiodiplodia* sp. [11, 12, 22] (figura 3). La enfermedad ocasionada por este patógeno ocasiona pudrición de fruto, muerte descendente en ramas y pudrición del pedúnculo, el patógeno es cosmopolita, sin embargo, causa

mayores pérdidas en zonas húmedas y calientes, este hongo se encuentra presente en Nayarit y Veracruz. Se ha reportado como patógeno en Egipto, India, República de Mauricio, Cuba y USA (Florida) [1, 18, 21, 23, 24].



Fig. 3. Colonia, conidióforos y conidio de *Lasiodiplodia* sp (40x).

Colletotrichum sp**.** Colonias blancas rosáceas o salmón, de forma redonda algodonosa, elevada y con anillos concéntricos. Los conidióforos son hialinos, de pared delgada, algunos presentan septos; los conidios hialinos ovoides y cilíndricos, aseptados con tamaño entre 10-6 x 4-5 µm aprox. (largo/ancho) figura 4.



Fig. 4. Colonia, conidióforos y conidio de *Colletotrichum* sp (40x).

Estas características corresponden a *Colletotrichum* sp [9, 11, 12, 20, 22, 25, 26] este hongo es el más cosmopolita dentro de las anonáceas ocasionando antracnosis, está entre las enfermedades más comunes y perjudiciales. En Nayarit, la incidencia del hongo en la fruta y flor durante en el periodo más lluvioso (julio-octubre) puede ser superior al 50% o hasta el 100% generando altas pérdidas económicas en el cultivo de guanábana [1, 9].

Las pruebas de patogenicidad realizadas en los frutos inoculados bajo las condiciones experimentales, dieron como resultado el desarrollo de sintomatologías de enfermedades después de 5 días de inoculación, en la figura 5, se muestra el daño producido por los hongos inoculados en el fruto de guanábana.

Los frutos a partir del tercer día de inoculación presentaron coloración café, olor característico del fruto, ablandamiento en epicarpio y mesocarpio, al llegar el quinto día se observó en la parte inoculada del fruto áreas de color blanco o de color gris olivo con lesiones necróticas; el hongo que presento mayor grado de infección en los frutos fue *Lasiodiplodia* sp, el cual se encuentra presente en la mayoría de los aislados.

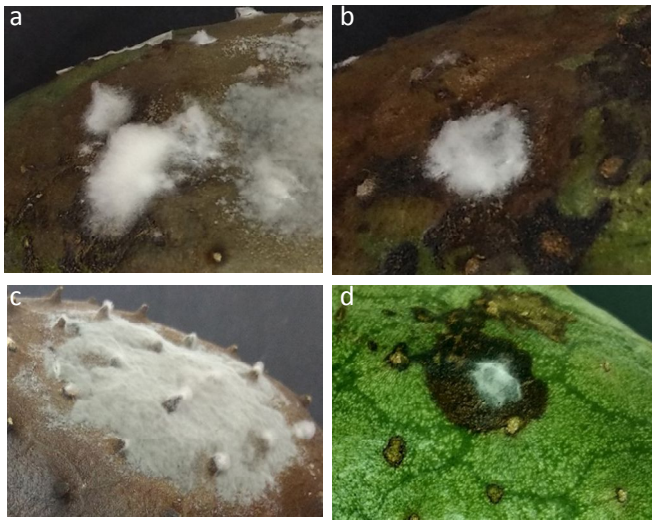


Figura 5. Daño causado por cepas fúngicas en guanábana después de 5 días de desarrollo, a) *Gliocladium* sp, b) *Rhizopus* sp, c) *Lasiodiplodia* sp, d) *Colletotrichum* sp.

Los hongos adquieren mayor severidad y ocasiona los síntomas de las enfermedades cuando los frutos comienzan a madurar [10]. Además, los reaislamientos a partir de los frutos inoculados si comparten las características de las cepas aisladas que fueron inoculadas.

CONCLUSIONES

Más de un género de hongo se encontró como causante de enfermedad en el fruto de guanábana, a partir de los aislamientos, la caracterización morfológica y prueba de patogenicidad se identificaron a los géneros *Colletotrichum sp, Rhizopus sp, Lasiodiplodia sp* y *Gliocladium sp*, como patógenos potenciales del fruto de guanábana. Se considera fundamental desarrollar investigaciones para determinar las especies de los hongos aislados para poder establecer estrategias de control contra las enfermedades fungosas.

AGRADECIMIENTOS

"Proyecto apoyado por el fondo sectorial de investigación en materias Agrícola, Pecuaria, Acuacultura, Agrobiotecnología y recursos Fitogenéticos", No. 266891.

REFERENCIAS

[1] L. M. Hernández Fuentes, R. Gómez Jaimes y J. A. Agustín, Importancia de las plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano, Nayarit, México: Inifap, 2013.

[2] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, «SIAP,» 2014. [En línea]. Available: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/. [Último acceso: 2016].

[3] V. Hernández Librado, «La situación de las annonaceae en México: principales plagas, enfermedades y su control,» Revista Brasileira de Fruticultura, vol. 36, pp. 44-54, 2014.

[4] S. E. Cayeros Altamirano, F. J. Robles Zepeda y A. Jiménez González, «Guanábana en el municipio de Compostela, Nayarit,» Educate conciencia, vol. 13, nº 14, pp. 27-36, 2017.

[5] C. Sistema Nacional de Información Forestal, «Annona muricata,» Species Plantarum, vol. 1, pp. 1-6, 2012.

[6] L. Vidal Hernández, H. López Moctezuma, N. A. Vidal Martínez, R. Ruiz Bello, D. G. Castillo Rocha y R. G. Chiquito Contreras, «La situación de las Annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control,» Congresso Internacional y Encuentro Brasileño sobre Annonaceae, vol. 36, nº Edición especial, pp. 44-54, 2014.

[7] M. E. García Álvarez, «La guanábana (Annona muricata L.). Propiedades y usos,» Revista CitriFrut, vol. 27, nº 1, pp. 69-70, 2010.

[8] J. Janick y R. E. Paull, The Encyclopedia of Fruit & Nuts, USA: CABI, 2008.

[9] I. Andrades, F. Yender, J. Labarca, D. Ulacio, C. Paredes y Y. Marín, «Evaluación de la antracnosis (Colletotrichum sp.) en guanábana (Annona muricata L.) tipo Gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela,» Revista UDO Agrícola, vol. 9, nº 1, pp. 148-157, 2009.

[10] N. Agrios, Fitopatología, México: Limusa, 1999.

[11] H. L. Barnett y B. B. Hunter, «Illustrated Genera of Imperfect Fungi,» Minnesota, Burgess Pub. Co. 1972, 1998, p. 240.

[12] T. Watanabe, Pictorial atlas of soil and seed fungi : morphologies of cultured fungi and key to species, Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, 2010.

[13] S. Montoya Angulo, J. E. Cruz Ortega, J. R. García Quintero y C. R. Morales Cázarez, Fitopatología General, vol. 4334, Culiacán: Universidad Autónoma de Sinaloa, 1999, p. 4.

[14] J. Benbow y D. Sugar, «Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast application,» Plant Disease, vol. 9, nº 83, pp. 839-844, 1999.

[15] H. Castillo, R. Rojas y M. Villalta, «Gliocladium sp., agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras,» Tecnología en Marcha, vol. Edición especial bioconrol, pp. 65-73, 2015.

[16] D. Sreekanth, G. K. Sushim, A. Syed, B. M. Khan y A. Ahmad, «Molecular and Morphological Characterization of a Taxol-Producing Endophytic Fungus, Gliocladium sp., from Taxus baccata,» Mycobiology, vol. 39, nº 3, pp. 151-157, 2011.

[17] R. C. Ploetz, Diseases of Tropical Fruit Crops, USA: CABI, 2003.

[18] R. Urtiaga, «Indice de Enfermedades en Plantas de Venezuela y Cuba,» International Mycological Institute , UK, 2000.

[19] S. S. Navi, R. Bandyopadhyay, A. J. Hall y P. J. Bramel-Cox, A Pictorial Guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1999.

[20] L. F. Arauz Cavallini, «Fitopatología un enfoque agroecológico,» Costa Rica, UCR, 2011, p. 519.

[21] E. N. Becerra Leor y X. . R. González, «Manejo Integral de plagas y enfermedades del Guanábano,» Anonáceas. Plantas antiguas.Estudios recientes parte 2, vol. 1, nº 2, pp. 173-192, 2015.

[22] P. A. Picos-Muñoz, R. S. García-Estrada, J. León-Félix, A. Sañudo-Barajas y R. Allende-Molar, «Lasiodiplodia theobromae en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control,» Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 33, nº 1, pp. 54-74, 2015.

[23] W. M. Haggag y M. A. Nofal, «Improving the biological control of Botryodiplodia disease on some Annona cultivars using single or multi-bioagents in Egypt,» Biological Control, vol. 38, nº 3, pp. 341-349, 2006.

[24] M. Almaguer Chávez, K. C. Sánchez Espinosa y L. Díaz Vázquez, «Lasiodiplodia theobromae en la atmósfera de La Habana,» Revista Cubana de Ciencias Biológicas, vol. 4, nº 2, pp. 130-134, 2015.

[25] C. S. Chethana, P. Chowdappa, K. V. Pavani, C. N. .. Biju, R. Praveena y A. M. Sujatha, «Morphological and multi-loci gene analysis of five species of Colletotrichum responsible for

anthracnose on black pepper in South India,» International Journal of Advanced Biotechnology and Research, vol. 6, nº 3, pp. 327-342, 2015.

[26] B. S. Weir, P. R. Johnston y U. Damm, «The Colletotrichum gloeosporioides species complex,» StudieS in Mycology, vol. 73, pp. 115-180, 2012.

ACARICIDAL EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM *Citrus sinensis* AGAINST CATTLE TICK *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.*

[1*]Lazcano-Díaz, E., [1]Padilla-Camberos, E., [1]Martínez-Velázquez, M., [2]Castillo- Herrera, G., [2]Estarron-Espinosa, M.

1. CIATEJ- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jal., México.
2. CIATEJ- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco Camino Arenero1227, El Bajío del Arenal, CP 4509, Zapopan, Jal., México.

*Autor para correspondencia: eslazcano_al@ciatej.edu.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La garrapata del género *R. microplus* es el ectoparásito de mayor importancia económica para la industria ganadera, provocando daños en la piel, disminución en la producción de leche, sin embargo, la problemática de mayor importancia es el desarrollo de resistencia por el uso indiscriminado de productos químicos, debido a esto el uso de productos naturales se considera como una alternativa para el control de este ectoparásito, es por ello que en este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad acaricida *in vitro* del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) en diferentes etapas del ciclo de vida de la garrapata. Se obtuvo la composición química del aceite esencial por GC-MS. Se realizó la prueba de inmersión de adultas y paquete de larvas, en ambas pruebas el aceite esencial de naranja se evaluó a diferentes concentraciones (5 a 0.31%). El aceite esencial mostro un porcentaje del control del 62.5%, mientras que en la prueba de paquete de larvas la $CL_{50,\ 99\ y\ 99.9}$ fueron de .0561, 2.54 y 2.81% respectivamente. El aceite esencial de naranja mostro actividad acaricida contra la garrapata, sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan desarrollar formulaciones para su uso como una alternativa para el control de la garrapata.

Palabras clave: Garrapatas; resistencia; control; aceite esencial.

INTRODUCCIÓN

En diferentes partes del mundo incluido, México, el desarrollo de la garrapata *B. microplus* se ve favorecido por las condiciones climáticas, convirtiéndose en una de las más distribuidas en la ganadería [1], en México se encuentra distribuida aproximadamente en el 53% del territorio, generando pérdidas por 573.61 millones de dólares anualmente, debido a la reducción en ganancia de peso y disminución en producción de leche [2], mientras los costos por el uso de productos químicos para su control se estiman en más de $942.23 millones de dólares anualmente [3].

El uso de productos químicos ha sido el principal método empleado para el control de la garrapata *B. microplus*, sin embargo, el uso continuo y descontrolado de éstos ha generado daños al ambiente e incluso el desarrollo de resistencia de manera acelerada, provocando que el control de la garrapata cada

vez sea más difícil y costoso, debido a que la efectividad de los productos se ve reducida, limitando así las alternativas de control [4, 5, 6].

Las investigaciones para el desarrollo de nuevos productos químicos para el control de la garrapata se han vuelto costosas, ya que se invierten 100 millones de dólares limitadas en tiempo, sin embargo, estas investigaciones están limitadas en mecanismos de acción y tiempo lo cual ha llevado a la búsqueda de alternativas para el desarrollo de nuevos productos [7, 5].

Los productos derivados de plantas particularmente los aceites esenciales, han mostrado ser una de las alternativas con potencial para el desarrollo de productos para el control de la garrapata, ya que han mostrado afectar su ciclo de reproducción en diferentes etapas de su vida, aunado a esto por su naturaleza se le considera seguros para uso, por su baja toxicidad, rápida biodegradación y por lo complejo de su composición se sugiere ayuda a la prevención para el desarrollo de resistencia [8, 9, 10]. Es por esto que en este trabajo se evaluó la actividad acaricida *in vitro* del aceite esencial de naranja en las diferentes etapas del ciclo de vida de la garrapata.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aceite esencial de naranja fue proporcionado por Frutech International Corporation, su composición química se determinó por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS). Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fueron colectadas en el municipio de Tapalpa en el Estado de Jalisco. La prueba de inmersión de adultas se realizó de acuerdo con la NOM-ZOO-06-1993 [11]. Se utilizó la Prueba de paquete de larvas [12] con algunas modificaciones; las diluciones se prepararon utilizando como solución disolvente la mezcla de tricloroetileno y aceite de oliva (2:1), se humedecieron papeles filtro (Whatman No 1) de 7.5 cm x 8.5 cm dejándolos dos horas en campana de extracción para permitir que el tricloroetileno se evapore antes de ser doblado en paquetes utilizando sujetapapeles. Se colocaron en promedio 100 larvas por paquete, se mantuvieron en incubadora a 27°C y 80% humedad relativa durante 24 horas. Las concentraciones evaluadas del aceite de naranja en ambas pruebas fueron de 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.31 % v/v. Ambas pruebas se realizaron por duplicado, el grupo control no contenía aceite.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el aceite esencial de *Citrus sinensis* se identificaron 25 compuestos que representan el 96.78% de la composición total del aceite, el componente mayoritario con el 84.61% es limoneno seguido de mirceno, α-pineno y linalool con el 4.73, 1.67 y 1.10% respectivamente.

En la prueba de inmersión de adultas el aceite esencial de naranja redujo en un 26.4±8.5 % (Fig. 1), afectando el porcentaje de eclosión en un 48.3±1.0% (Fig. 2) ambas en la máxima concentración evaluada del 5%, los porcentajes de control obtenidos van del 36.0±5.6 a 62.5±3.7% (Fig. 3). En la prueba de paquete de larvas se determinaron la $CL_{50,\ 99\ y\ 99.9}$ (Fig. 4).

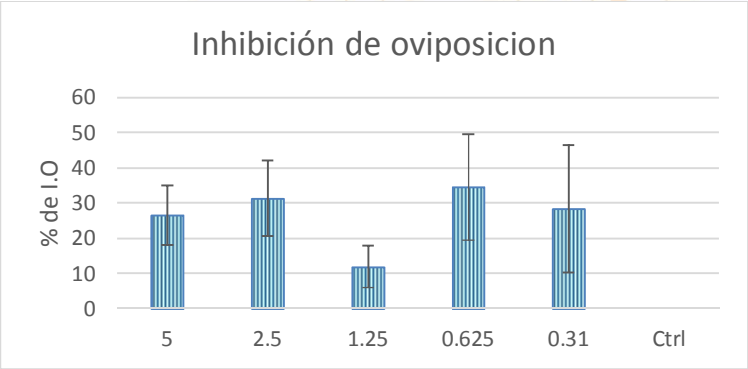


Fig.1 Porcentaje de inhibición en oviposición en garrapatas adultas tratadas con las diferentes concentraciones de aceite esencial de naranja.

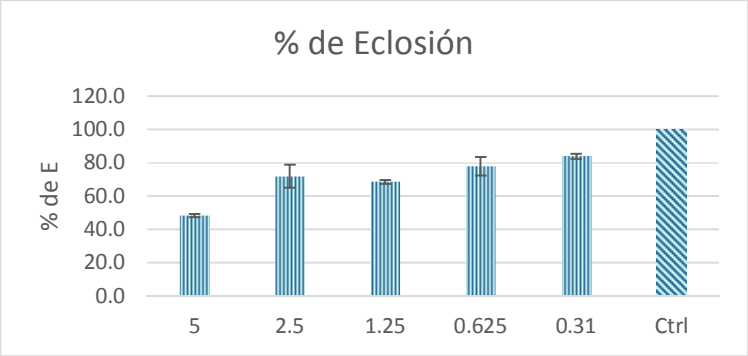


Fig. 2 Porcentaje de eclosión en garrapatas adultas tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial de naranja.

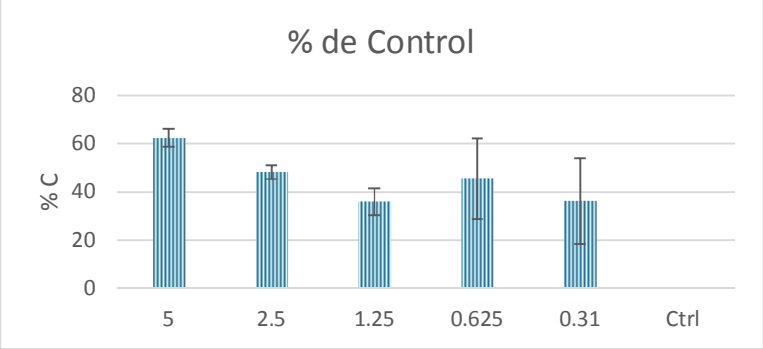


Fig.3. Porcentaje de control de garrapatas adultas tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial de naranja.

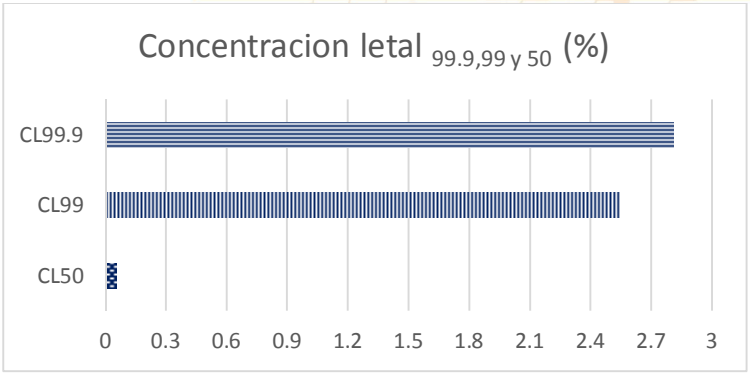


Fig. 4. Concentración letal ($CL_{99.9,\ 99\ y\ 50}$) obtenida de la prueba de paquete de larvas.

La actividad larvicida de *Citrus sinensis* contra insectos y artrópodos ha sido ampliamente reportada, tal es el caso de un extracto etanólico contra *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* [13, 14], también el aceite esencial ha sido evaluado contra *Ae. aegypti* y *An. gambiae* en donde se sugiere que esta actividad se puede deber a algunos compuestos como el limonene o linalool al ser de los que se encuentran en mayor proporción en su composición [15, 16], Chungsamarnyart y Jasawan (1996) [17] reportaron la actividad del aceite esencial de *Citrus sinensis* en garrapatas adultas *Boophilus microplus,* provocando el 99, 79 y 49 % de mortalidad en las concentraciones del 20, 10 y 7 %, respectivamente; en el presente estudio se obtuvo una mortalidad del 62.5% en concentración del 5%, debido a estos resultados se podría sugerir que 57 el compuesto responsable de *Citrus sinensis* es limonene, sin embargo éste en concentración del 7% provoca una mortalidad del 14% (Chungsamarnyart & Jansawan, 1996),en base a estos resultados se podría sugerir que limoneno al interactuar con otros compuestos como Mirceno, linalool y α-pineno, podrían actuar de modo sinérgico afectando así el ciclo de vida de la garrapata *R. microplus.*

CONCLUSIONES

El aceite esencial de naranja mostro actividad acaricida contra la garrapata *R.microplus*, sin embargo es necesario realizar estudios que permitan observar su efectividad en pruebas *in vivo,* lo cual permitirá evaluar su potencial para el desarrollo de formulaciones como alternativa para el control de la garrapata.

REFERENCIAS

[1] A. A. Guglielmone, R. G. Robbins, D. A. Apanaskevich, T. N. Petney, A. Estrada-Peña y I. G. Horak, Hard ticks of the world (Acari:Ixodida:Ixodidae), Springer , 2014.

[2] R. I. R. Vivas, A. R. Aguilar, G. B. Estrella, Z. S. G. Vázquez, R. R. Cruz y H. F. Sánchez, Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino, 1 ed., vol. 4, INIFAP, Ed., México, D.F: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, 2006, p. 29.

[3] G. D. Domínguez, F. Torres Agatón y R. Rosario-Cruz, «Economical Assessment of *Rhipicephalus microplus* Tick Control in Mexico,» Ciba Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias, vol. 5, nº 9, 2016.

[4] A. Araque, S. Ujueta, R. Bonilla, D. Gómez y J. Rivera, «Acaricidal Resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in some Colombian Cattle farms,» Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales Actualidad & Divulgación Científica, vol. 17, nº 1, pp. 161-170, 2014.

[5] J. F. Graf, R. Gogolewski, N. Leach-Bing, G. A. Sabatini, M. B. Molento, E. L. Bordin y G. J. Arantes, «Tick control: an industry point of view,» Parasitology, vol. 129, pp. S427-S442, 2004.

[6] M. A. Taylor, «Recent Developments in Ectoparasiticides- Review,» The Veterinary Journal, vol. 161, pp. 253-268, 2001.

[7] T. Kiss, D. Cadar y M. Spînu, «Tick prevention at a crossroad: New and renewed solutions,» Veterinary Parasitology, vol. 187, nº 3-4, p. 357–366, 2012.

[8] C. G. Athanassiou, P. U. Rani y N. G. Kavallieratos, «The Use of Plant Extracts for Stored Product Protection,» de Advances in Plant Biopesticides, D. Singh, Ed., India, Springer, 2014, pp. 131-147.

[9] G. Benelli, P. Romana, A. Canale y H. Mehlhorn, «Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?,» Parasitology Research , vol. 115, nº 7, pp. 2545-2560, 2016.

[10] D. N. Price y M. S. Berry, «Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches,» Journal of Insect Physiology, vol. 52, nº 3, p. 309–319, 2006.

[11] NOM-ZOO-06-1993, «NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-ZOO-1993, requisitos de efectividad biológica para los,» SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, pp. 1-15, 1994.

[12] FAO, «Resistance Managentand integrated Parasite Control in Rumiants,» 2004. [En línea]. Available: http://www.fao.org/ag/aga.html.

[13] K. Murugan, P. M. Kumar, K. Kovendan, D. A. Subrmaniam y J. S. Hwang, «Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae),» Parasitology Research, vol. 111, nº 4, p. 1757–1769, 2012.

[14] K. G. A. Kumar, A. K. Sharma, S. Kumar, D. D. Ray, A. K. S. Rawat, S. Srivastava y S. Ghosh, Journal of Parasitic Diseases, pp. 1-7, 2016.

[15] A. F. d. O. Araujo, J. T. R. Paes, J. T. d. Deus, S. C. d. H. Cavalcanti, R. d. S. Nunes, P. B. Alves y M. d. L. d. G. Macoris, «Larvicidal activity of Syzygium aromaticum (L.) Merr and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*,» Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 3, nº 7, pp. 443-449, 2016.

[16] W. Okunowo, L. Afolabi, A. Oyedeji, E. Matanmi y O. Ayodele, «Larvicidal activity of essential oil from *Citrus cinensis* and *citrus paradisi* against *Anopheles gambiae*,» Biokemistri , vol. 28, nº 1, pp. 16-23, 2016.

[17] N. Chungsamarnyart y W. Jansawan, «Acaricidal activity of peel oil of *Citrus* spp. on *Boophilus microplus*» Natural Science, vol. 30, pp. 112-117, 1996.

DETERMINACIÓN DE COMPONENTES DEL THINNER EN SUELO Y SU EFECTO SOBRE LA LOMBRIZ DE TIERRA ROJA CALIFORNIANA.

[1]Rengifo-Guerrero, C.A., [2]Vásquez-Murrieta, M.S., [1*]Franco-Hernández, M.O.

1. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Ciencias Básicas, Ciudad de México, CP: 07340
2. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Ciudad de México, CP: 11340.

*Autor para correspondencia: mofrancoh@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La contaminación de suelos con derivados del petróleo es una problemática ambiental de gran interés por la peligrosidad que representa para el ambiente y para la salud humana. El thinner es utilizado como disolvente y adelgazante de pinturas, y posee compuestos cancerígenos como benceno y tolueno. La identificación y cuantificación de estos contaminantes depende de las características del suelo y la técnica de extracción utilizada. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto que tiene el thinner sobre la lombriz de tierra roja californiana (*Eisenia foetida*), determinar su concentración letal media (CL50) y determinar el porcentaje de extracción de sus componentes en suelos de bosque (Toluca) y salino – alcalino del exlago de Texcoco. El thinner presentó en su composición tolueno (263 mg/ml), 2 – butoxietanol (48 mg/ml), metanol (305 mg/ml) y benceno (1.40 mg/ml), y provocó adelgazamiento, decoloración y fraccionamiento en los tejidos de las lombrices de tierra. La CL50 correspondió a 12.46 ml de thinner por kg de suelo (bs) (3273.44 mg tolueno/kg suelo (bs) y 17.19 mg benceno/kg suelo (bs)). Los porcentajes de extracción fueron superiores al 60%, con mayor rendimiento en suelo salino – alcalino y se detectó que el contenido de materia orgánica afecta el porcentaje de extracción.

Palabras clave: Suelo salino-alcalino, Suelo de bosque, CL50, *Eisenia foetida*, BTX.

INTRODUCCIÓN

El benceno y el tolueno pertenecen al grupo BTEX, los cuales son sustancias ampliamente reconocidas como peligrosas para la salud humana, y se pueden encontrar principalmente en productos derivados del petróleo. La contaminación de suelos con este tipo de sustancias es una de las problemáticas ambientales de mayor interés, ya que este tipo de compuestos presentan alta solubilidad en agua y gran capacidad de adhesión a las partículas del suelo, por lo cual la extracción de los mismos para su identificación y cuantificación depende de las características del suelo y la técnica utilizada.

El diluyente de pintura conocido como thinner es un derivado del petróleo que comúnmente se emplea en la fabricación de pinturas y textiles. Se ha reportado que dentro de sus componentes principales se pueden encontrar sustancias como tolueno y benceno, además de otros compuestos como hexano y algunos alcoholes [1]. En la literatura científica se han reportado casos de intoxicación y muerte de

personas por la ingestión y exposición en ambientes contaminados por estas sustancias, lo que se relaciona con una inapropiada utilización y una inadecuada disposición final.

Teniendo en consideración las implicaciones que trae consigo la contaminación y exposición a estos componentes tanto para la salud humana y el medio ambiente, los esfuerzos en investigación se han centrado en encontrar alternativas y desarrollar técnicas que permitan un adecuado tratamiento de los residuos que causan estos problemas.

El vermicomposteo es una técnica de biorremediación que emplea lombrices de tierra las cuales descomponen la materia orgánica del suelo, ayudando a estimular e incrementar la actividad de la flora microbiana presente [2]. Esta técnica ha sido estudiada como alternativa para el tratamiento de residuos y ambientes contaminados con residuos orgánicos. Se han reportado investigaciones para el tratamiento de suelos contaminados con herbicidas (Tejada et al. [3]) y petróleo crudo (Ekperusi & Aigbodion, [4]), sin embargo es necesario estudiar los efectos que tiene el thinner y sus componentes sobre las lombrices de tierra con el fin de determinar el potencial de uso de esta técnica para la descontaminación de suelos con este tipo de sustancias.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto que tiene el thinner sobre la lombriz de tierra roja californiana (*Eisenia foetida*) y determinar su concentración letal media (CL50). Así mismo, se determinó el porcentaje de extracción de estas sustancias en suelos clasificados texturalmente como franco – arenosos, provenientes de bosque y un suelo salino – alcalino del exlago de Texcoco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación CL50 y efecto sobre Eisenia foetida

Se utilizó thinner bajo la marca comercial COMEX ® y se caracterizó a través de cromatografía de gases (Perkin elmer, USA) empleando un detector de ionización de llama (FID). Asi mismo, se utilizó lombriz de tierra roja californiana (*Eisenia foetida*), obtenida de un lombricultivo ubicado en el invernadero de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología – UPIBI. Se utilizaron lombrices en estado adulto, sexualmente maduras y con el clitelio desarrollado [5].

La concentración letal media (CL50), se determinó de acuerdo con lo establecido por An & Lee [6]. Se tomaron 200g de vermicomposta previamente tamizada proveniente de la pila de compostaje del invernadero y se depositaron en un recipiente plástico de 1000 ml. Se adicionaron 5g de residuo de zanahoria como fuente de alimento para la lombriz, y 5g de pasto seco para facilitar el proceso de aireación. Posteriormente se agregó agua para ajustar el porcentaje de humedad al 60%. En cada recipiente, se pesaron y agregaron 11 lombrices adultas (300 ± 50 mg; 3 ± 0.5 cm) obtenidas de la misma pila de compostaje. Cada recipiente se cubrió con un trozo de malla mosquitera (<2mm) y se dejó en reposo por un periodo de 24 horas con el fin de que las lombrices se adaptarán a las nuevas condiciones. Pasado este tiempo, a cada recipiente se agregaron entre 0 y 2 ml de thinner (incremento de 0.2 ml respectivamente), se cubrieron nuevamente y se dejaron en el invernadero. El muestreo se llevó a cabo a las 24 horas, en el cual se monitoreo el estado de las lombrices (respuesta al estímulo, color, individuos muertos). Con los datos obtenidos, se elaboró la curva dosis – respuesta de las diferentes concentraciones y se calculó el valor de la concentración letal (CL 50) a las 24 y 48 horas, a través del método de unidades probabilísticas Probit [7].

Determinación porcentaje de extracción en suelo

Se utilizaron dos tipos de suelo, suelo de Bosque (Villa Guerrero, Toluca) y suelo salino – alcalino obtenido del exlago de Texcoco. Ambos suelos fueron previamente tamizados en un tamaño de malla <2 mm y caracterizados texturalmente empleando un densímetro de Bouyoucos y el diagrama triangular de clases texturales básicas de suelo [8]. El contenido de materia orgánica se determinó a través del método de oxidación en medio ácido en presencia de $K_2Cr_2O_7$ como indicador. Posteriormente se tituló con $FeSO_4$ [9]. La concentración de thinner utilizada correspondió al valor de CL50 determinado previamente. Para la determinación del porcentaje de extracción se empleó una técnica utilizando acetona como solvente orgánico. Posteriormente se agregó Na_2SO_4 anhidro para retirar la humedad de las muestras y se llevó a un proceso de agitación y sonicación por 20 minutos. Después las muestras se llevaron a filtración (0.22 µm) y se analizaron por cromatografía de gases como se describió anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CL50 y efecto sobre Eisenia foetida

Los resultados obtenidos en los cromatogramas mostraron que el thinner tiene en su composición sustancias tales como Tolueno, Benceno, Metanol, mezcla de hexanos, y 2- Butoxietanol (tabla 1), siendo el Metanol y el Tolueno los componentes que se encuentran en mayor concentración. Sustancias como el 2 – Butoxietanol han sido previamente estudiadas [10] y se ha reportado como causante de efectos hematológicos en ratas de laboratorio.

Tabla 1. Concentración de componentes de thinner y valor de CL50 por componente.

Compuesto	***Concentración (mg/ml)***	***CL 50 (mg/kg suelo b.s.)***
Metanol	*305*	*3790*
Tolueno	*263*	*3273*
2 – Butoxietanol	*48*	*599*
Hexanos	*70*	*872*
Benceno	*1.40*	*17*

Los resultados para el cálculo de CL50 a las 24 horas mostraron que un volumen de 12.46 ml de thinner por kilogramo de suelo seco provocó la mortalidad del 50% de la población de individuos estudiados. Según la composición del thinner utilizado, se encontraron sustancias tales como tolueno, benceno, metanol, hexanos y 2-butoxietanol, siendo el tolueno uno de los componentes mayoritarios, por lo cual es muy probable que los resultados encontrados se deban al efecto tóxico de esta sustancia. Estos resultados fueron diferentes a los reportados por Liu et al. [11] quienes reportaron valores de LC50 de 583.6, 346.8 y 192.4 mg/kg de suelo a las 24 horas en un estudio de efectos ecotoxicologicos de tolueno, etilbenceno y xileno respectivamente, sobre la lombriz de tierra *Eisenia fétida.* Así mismo, los valores de CL50 encontrados para tolueno y benceno fueron superiores a la concentración máxima permitida por leyes mexicanas (40 y 6 mg/kg suelo (b.s)) y en otros países tales como Holanda (13.0 y 0.11 mg/kg suelo (b.s)) y Brasil (0.14 y 0.03 mg/kg suelo (b.s)) respectivamente [12].

Por otra parte, se encontró que la exposición de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* al thinner provocó efectos tóxicos y nocivos y resultó letal para estos organismos. Se observaron cambios y anormalidades

morfológicas en las lombrices, los cuales se pueden apreciar en la figura 1. Entre los individuos muertos, se encontraron efectos morfológicos tales como adelgazamiento, fraccionamiento, desintegración y generación de una película mucosa sobre la superficie de las lombrices. Efectos similares fueron reportados por An & Lee [6] utilizando Tolueno y MTBE. Así mismo, se encontró que los niveles de daño no dependen de la concentración de thinner utilizado, ya que los cambios morfológicos se observaron por igual en todos los volúmenes utilizados.

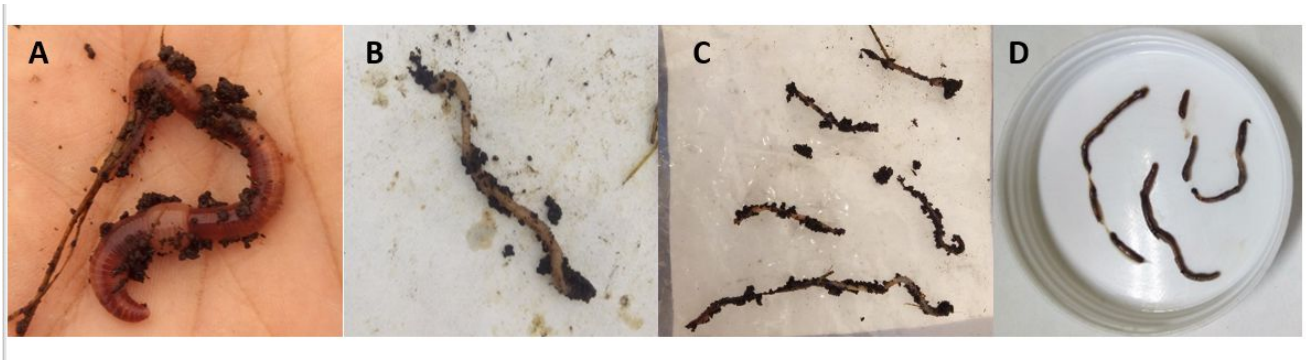


Figura 1. Efectos de la exposición al thinner sobre la morfología de lombriz de tierra *Eisenia foetida* (A: Normal; B: Decoloración; C: Adelgazamiento; D: Fraccionamiento).

Porcentaje de extracción de thinner en suelo

La determinación de textura mostró que ambos suelos corresponden a la clasificación Franco arenoso. Así mismo, se encontró que el suelo de bosque tiene hasta 4 veces más concentración de materia orgánica que el suelo salino alcalino (tabla 2). Lo anterior concuerda con lo reportado por Dendooven et al. [13] quienes indicaron que el suelo salino – alcalino del ex lago de Texcoco está cubierto por una limitada vegetación halofilica, por lo cual el contenido de materia orgánica se encuentra altamente reducido. Por su parte, los suelos de bosque se caracterizan por tener altos contenidos de materia orgánica, proveniente de fuentes nativas tales como partes de vegetación (hojas, flores, frutos, ramas) los cuales se encuentran en diferentes estados de descomposición, así como los cuerpos sin vida de animales e insectos que forman parte de su ecosistema [14]

.

Tabla 2. Clasificación textural de los suelos y % de materia orgánica.

Componente	***Suelo de Bosque***	***Suelo Salino - Alcalino***
Arcilla (%)	*4.20 ± 0.041*	*19.34 ± 3.30*
Limo (%)	*39.66 ± 1.89*	*25.42 ± 3.68*
Arena (%)	*56.28 ± 1.93*	*55.22 ± 1.09*
Textura	*Franco Arenoso*	*Franco Arenoso*
%Materia orgánica	*184.03 ± 0.78*	*42.11± 0.31*

Los porcentajes de extracción obtenidos se muestran en la tabla 3. Con la técnica empleada no fue posible extraer parte del benceno presente en el thinner. Para los demás componentes, se encontró que los niveles de extracción fueron superiores al 60%, presentando mejor rendimiento en el suelo salino – alcalino. Según Prokop et al. [15] la materia orgánica tiene gran afinidad por los compuestos orgánicos presentes, lo cual reduce la movilidad y disponibilidad de los mismos. Lo anterior concuerda con los

resultados encontrados, ya que en el suelo de bosque, con concentraciones de materia orgánica más alta, se presentó el menor rendimiento en la extracción.

Tabla 3. Porcentaje de extracción de los componentes del thinner.

Componente	***[ ] Inicial (mg/kg ss)***	***Suelo de Bosque (mg/kg ss)***	***% Extracción***	***Suelo Salino – Alcalino (mg/kg ss)***	**% Extracción**
Metanol	*6391.05 ± 12.87*	*4454.53 ± 15.52*	*69.7*	*5587.44 ± 23.67*	87.42
Hexanos	*1145.72 ± 8.09*	*914.28 ± 22.43*	*79.82*	*1068.43 ± 13.68*	93.28
Tolueno	*5519.03 ± 32.07*	*4272.40 ± 21,93*	*77.41*	*4504.95 ± 31.09*	81.63
2 - Butoxietanol	*997.62 ± 4.63*	*731.04 ± 6.86*	*73.47*	*773.05 ± 2.90*	77.51

CONCLUSIONES

El thinner provocó efectos morfológicos tales como decoloración, fraccionamiento y adelgazamiento sobre la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, sin embargo estos resultados mostraron que la utilización de una técnica de vermicomposteo representa un potencial como alternativa para la descontaminación de suelos contaminados con thinner u otro tipo de sustancias que contengan este tipo de compuestos, ya que puede ser utilizada en ambientes contaminados con concentraciones hasta 100 veces más altas con respecto a lo estipulado por normas ambientales.

El porcentaje de extracción de los componentes del thinner fue menor en suelo de bosque, lo cual guarda relación con el contenido de materia orgánica presente en los suelos, y a su vez estaría relacionado con niveles de recuperación más bajos y una menor biodisponibilidad, lo que representaría una posible contaminación a largo plazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] G. Baydas, F. Ozveren, M. Tuzcu and A. Yazar. "Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats". *European Journal of Pharmacology*, Vol. 512, no. 2-3, pp.181–187, 2005.

[2] Z. Chen, S. Hu, C, Hu, L. Huang, H. Liu and J. Vymazal. "Preliminary investigation on the effect of earthworm and vegetation for sludge treatment in sludge treatment reed beds system". *Environ Sci Pollut Res*., Vol. 23, no. 12, pp. 11957 – 11963, 2016.

[3] M. Tejada, I. Gomez, L. Franco – Andreu and C. Benitez. "Role of different earthworms in a soil polluted with oxyfluorfen herbicide. Short-time response on soil biochemical properties". *Ecological Engineering*, Vol. 86, pp.39–44, 2016.

[4] O.A. Ekperusi and F.I. Aigbodion. "Bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons in diesel contaminated soil with earthworm: *Eudrilus eugeniae*". *Biotech*, Vol. 4, no. 1, pp.540 – 553, 2005.

[5] O. Espinoza - Navarro, C. Ferreira and E. Bustos-Obregón. "Effect of Methamidophos on the Morphology and Male Reproductive Parameters of the Earthworm *Eisenia foetida*". *Int. J. Morphol*., Vol, 31, no. 3, pp.1097-1103, 2003.

[6] Y.J. An and W.M. Lee. "Comparative and combined toxicities of toluene and methyl tert-butyl ether to an Asian earthworm *Perionyx excavates*". *Chemosphere*, Vol. 71, no. 3, pp. 407-411, 2008.

[7] L.C. Fernández, N. G. Rojas, T. G. Roldán, M. E. Ramírez, H. G. Zegarra, R. U. Hernández, R. J. Reyes, D. Flores y J. M. Arce. "Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados" Instituto Mexicano del Petróleo, Ciudad de México, 2006.

[8] Dexter, A. Soil physical quality Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic mailer, and effects on root growth. *Geoderma*, Vol. 120, pp.201–214, 2004.

[9] L. Qi, J. Li, Z. Lin, Z. Li, Y. Li, X. Yang, J. Zhang, B. Zhao. "Temperature effects on soil organic carbon, soil labile organic carbon fractions, and soil enzyme activities under long-term fertilization regimes". *Applied Soil Ecology*, Vol. 102, pp. 36 – 45, 2016.

[10] A. Starek, W. Szymczak, L. Zapor. "Hematological effects of four ethylene glycol monoalkyl ethers in short-term repeated exposure in rats". *Archives of Toxicology*, Vol. 82, no. 2, pp.125-136, 2008.

[11] Y. Liu, Q. Zhou, X. Xie, D. Lin and W. Rong. "Toxic effects of toluene, ethylbenzene and xylene in soils on earthworm *Eisenia fetida* and wheat *Triticum aestivum. China Environmental Science*, Vol. 30, no. 11, pp.1501 – 1507, 2010.

[12] J. De Almeida, F. Augusto and I. Fontes. "Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados". *Ecletica Quimica*, Vol. 35, no. 3, pp.17–43, 2010.

[13] L. Dendooven, R. Alcántara – Hernández, C. Valenzuela – Encinas, M. Luna – Guido, F. Pérez – Guevara and R. Marsch. "Dynamics of carbon and nitrogen in an extreme alkaline saline soil: A review." *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 42, no. 6, pp.865–877, 2010.

[14] K.T. Osman. "Soil degradation, conservation and remediation. In Soil Degradation, Conservation and Remediation". *Springer Science*. pp. 149 – 226, 2014.

[15] Z. Prokop. A. Necasoya, J. Klanova, Cupr P. "Bioavailability and mobility of organic contaminants in soil: new three-step ecotoxicological evaluation" *Environ Sci Pollut Res,* Vol. 23, pp.4312–4319, 2016.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL LIRIO ACUÁTICO (*Eichhornia crassipes*).

*Tovar-Jiménez, X., Álvarez-Gacía, R., Favela-Torres, E. y Tellez-Jurado, A.

Universidad Politécnica de Pachuca. Carr. Pachuca-Cd. Sahagún km 20, Rancho Luna, Ex-Hacienda de Santa Bárbara. Municipio de Zempoala, Hidalgo, Mexico. CP. 42830. Tel. 7715477510 Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av. Michoácan y La Purísima,Ciudad de México, México. CP. 09340.

*Autor para correspondencia: food_chemistry_xtj@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El lirio acuático es una planta invasiva que crece de forma no controlada en cuerpos de agua provocando problemas ecológicos, económicos y de salud, y a pesar de las numerosas propuestas para su erradicación, la excesiva presencia de la planta sigue afectando [1]. A partir de esto surge la necesidad de desarrollar estrategias para el manejo sustentable del lirio, que permitan sanear y proteger cuerpos de agua en el país. En este sentido, una estrategia puede ser el aprovechamiento de sus propiedades biológicas, ya que empíricamente las hojas, raíces y flores son empleadas como analgésicas, antimicrobianas, sedantes, etc [2]. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar la composición fitoquímica y actividad antioxidante del lirio acuático para posteriormente establecer sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Para ello, se evaluó un extracto hexanolico y uno acuoso. El análisis fitoquímico indicó la presencia de alcaloides, carbohidratos, grasas, flavonoides, fenoles, saponinas, taninos y terpenoides, así mismo sólo el extracto hexanolico presentó actividad antioxidante.

Palabras clave: Lirio acuático; fitoquímicos; propiedades biológicas.

REFERENCIAS

[1] Martínez M., Gómez M.M. (2007). Integrated control of Eichhornia crassipes by using insects and plant pathogens in México. Crop Protection, 26: 1234-1238

[2] Kumar S., Joseph L., George M., and Sharma, A. (2011). "A review on anticoagulant/antithrombotic activity of natural plants used in traditional medicine". International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 8(1): 70–74.

HIDRÓLISIS QUÍMICO-BIOLÓGICA DE HOJA DE LIRIO ACUÁTICO PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

Cortés-Mendoza, L.J., González-Martín, N., Téllez-Jurado, A. y *Tovar-Jiménez, X.

Universidad Politécnica de Pachuca. Carr. Pachuca-Cd. Sahagún km 20, Rancho Luna, Ex-Hacienda de Santa Bárbara. Municipio de Zempoala, Hidalgo, Mexico. CP. 42830. Tel. 771547751

*Autor para correspondencia: food_chemistry_xtj@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El lirio acuático es una planta invasiva que crece de forma abundante y no controlada en cuerpos de agua, canales y sistemas de drenaje en países tropicales y aunque existen numerosas propuestas para la erradicación y manejo de la planta, la situación actual es que sigue afectando muchos cuerpos de agua, canales y sistemas de drenaje, provocando serios problemas ecológicos, económicos y de salud [1]. Con el propósito de aprovechar esta maleza y por sus características lignocelulósicas [2], se realizó en primer lugar la caracterización química de las hojas de la planta, posteriormente se estudió el efecto de la concentración de ácido sulfúrico [2 - 10% (v/v)] sobre la obtención de azúcares reductores y fenoles totales, este último se cuantificó garantizar la viabilidad del hongo a emplear en la hidrólisis biológica. Finalmente, se realizó la hidrólisis biológica se realizó a pH 5, 28 ºC ± 2 ºC con un extracto crudo enzimático de *Trichoderma harzianum*. Se encontró que la hoja presenta 31.1 ±0.6 de holocelulosa y 6.3 ±0.2 de lignina insoluble en ácido, por otra parte a 5% de H2SO4 se obtiene el mayor contenido de azucares reductores (90 mg/mL) y el menor contenido de fenoles totales (20 mg/L), así mismo la hidrólisis enzimática permitió obtener 98 mg/mL de azúcares reductores.

Palabras clave: Hidrólisis químico-biológica; Lirio acuático; sacarificación

REFERENCIAS

[1] Martínez M., Gómez M.M. 2007. Integrated control of *Eichhornia crassipes* by using insects and plant pathogens in México. Crop Protection, 26: 1234-1238

[2] Harun, M. Y., Radiah, A. D., Abidin, Z. Z., & Yunus, R. (2011). Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (Eichhornia crassipes). Bioresource technology, 102(8), 5193-5199.

EFECTO DE LA INOCULACION DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS EN SEMILLAS DE MELÓN (*Cucumis melo*).

Tovar-Hernández, I., Marín-Sánchez, J., Vázquez, A. y *Villegas-Rodríguez, F.

Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, carretera San Luis - Matehuala Km 14,5, Ejido palma de la Cruz, 78321, Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

*Autor para correspondencia: fabiola.villegas@uaslp.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Los hongos endófitos han recibido una creciente atención en los últimos años, ya que han demostrado tener un potencial económico en la Agronomía, debido a su posible uso como agentes de control biológico y su establecimiento endófito en cultivos de interés; entre ellos destacan los hongos entomopatógenos (HE), los cuales se utilizan principalmente en el manejo de plagas; dichos organismos ofrecen un campo amplio y prometedor para entender las relaciones planta - hongo y los mecanismos de defensa que estos últimos pueden inducir en las plantas (Arnold et. al, 2003; Schulz y Boyle, 2005). El presente estudio buscó evaluar el porcentaje de inhibición a hongos patógenos en semillas de melón inoculadas con HE y la colonización endófita de dos cepas de *Metarhizium anisopliae,* una comercial y una nativa (Ma28 y Ma25); y dos cepas de *Beauveria bassiana*, una comercial y una nativa (BB09 y Bb42). Para ello se colocaron 10 semillas por caja Petri con agar agua, con cinco repeticiones para cada tratamiento, además de un control con agua estéril e INEX-A@. A partir de la siembra y desarrollo de las cepas, se generaron soluciones de 1X108 conidios/mL contabilizando y ajustando las soluciones con la ayuda de un hematocitómetro. Las semillas fueron desinfectadas con una solución de cloro a 10 % sumergidas durante 3 min y alcohol a 70% sumergidas durante 3 min para posteriormente inocular cada semilla con 5 micro-litros de las soluciones. Se contabilizó durante 15 días el porcentaje de germinación y contaminación. Posteriormente, de las plántulas germinadas se tomaron tres secciones diferentes (raíz, tallo y hoja) de dos plántulas, las cuales se desinfectaron con cloro al 10 % sumergidas durante 3 minutos y alcohol al 70 % durante 3 minutos por tejido, se lavaron con agua estéril para eliminar residuos de cloro y alcohol, para después sembrarse en medio de cultivo ADS (agar dextrosa sabouraud), para evaluar si había presencia o ausencia de los HE en el tejido de las plantas. Se observó que de los cinco tratamientos evaluados, las cepas de *Metarhizium anisopliae* obtuvieron un porcentaje de 8 % de contaminación en comparación con el resto de los tratamientos, que obtuvieron un porcentaje mayor a 50 %, lo que sugiere que las cepas de *M. anisopliae* tienen mayor capacidad de inducir mecanismos de defensa contra Fitopatógenos en comparación con las cepas de *B. bassiana*. En cuanto a endofitismo, se encontró que las cepas Ma25, Bb42 y Bb09 fueron recuperadas de tejido vegetal, dichas cepas, por lo tanto tienen el potencial para volverse endófitas con los efectos benéficos esperados de dicha asociación.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae; Beauveria bassiana; bioensay*; hongos entomopatogenos; endofito.

REFERENCIAS

[1] Abello, J, F, Kelemu, F, Segenet, K, 2006, Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Cundinamarca, Colombia. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 7 (2) 55 -57.

[2] Bing, L, A, Lewis, L, C, 1992, Endophytic Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of plant growth stages and Ostrinia nubilalis (Lepidoptera: Pyralidae). Biocon Sci Technol 2:39–47

[3] Bonilla-Paez, M, 2012, tesis, inoculación y establecimiento endofítico de cepas de los hongos entomopatógenos Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae Y Lecanicillium lecanii en plantas de fríjol (Phaseolus vulgaris), Universidad del Valle Facultad de Ciencias Naturales y Exactas Programa Académico de Biología Santiago de Cali, Pp; 14 a 16.

[4] García, J, E, Posadas, J, B, Perticari, A, & Lecuona, R, 2011, Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. Advances in Biological Research, 5(1), 22-27.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

ESTUDIO QUÍMICO Y DE CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Psittacanthus rhynchantus* (BENTH.) *Kuijt loranthaceae*.

[1,2]*Olvera-Maldonado, M., [2]Llanos-Romero, R.E., [1]Villa-Hernández, J.M. y [2]Herrera-Santoyo, J.

1. Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM Iztapalapa
2. Laboratorio de fitoquímica, D.E.R.N., Facultad de Ciencias, UNAM

*Autor para correspondencia: mom_jaen@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Desde hace miles de años los humanos hemos utilizado las plantas como fuentes medicinales. La actividad biológica de las especies vegetales es debida a productos del metabolismo secundario que son de gran interés para el hombre, por sus amplias aplicaciones. El estudio fitoquímico permite la búsqueda de compuestos con actividad biológica que contrarresten enfermedades que requieran de estos componentes. Tal es el caso de los muérdagos, pertenecientes a la familia de las *Loranthaceaes*, que han sido estudiados y en los cuales se ha demostrado importante actividad farmacológica. Las actividades reportadas para algunas especies de la familia de las *Loranthaceaes* son: hipoglucemiantes (Acevedo, 2012), vasodilatadores (Bah, 2011) (Ibarra, 2010), antibacterial (Soberón, 2006) y antinflamatorios (Serra, 2017); así comocitotóxicos (Soberón, 2006). No se encontraron estudios fitoquímicos sobre *Psittacanthus rhynchantus*, lo que brinda un gran interés sobre este trabajo para poder enriquecer el conocimiento sobre este muérdago mexicano. Los objetivos de este estudio fueron: a) determinar los metabolitos secundarios sintetizados en esta especie; b) evidenciar en cuáles de los órganos se encuentran y c) medir sus efectos citotóxicos por medios de pruebas biológicas. El material biológico utilizado (tallo, hoja y flor) fue recolectado en el estado de Morelos en Tlaltenango, creciendo sobre una *Bursera grandifolia*. El material fue identificado en el herbario de la facultad de ciencias con el número de voucher 153857. Se secó y separaron los órganos de la planta; posteriormente fueron molidos y se obtuvieron extractos de cada órgano con disolventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol). A partir de cada uno de los extractos obtenidos se calcularon los rendimientos y se hicieron las pruebas para identificar los grupos de metabolitos secundarios. Posteriormente se realizaron pruebas utilizando como modelo biológico *Artemia salina, Bacillus subitilis* y *E. coli* para analizar los efectos citotóxicos de cada extracto. Los rendimientos de los extractos mostraron ser mayores en los metanólicos, seguidos de los hexánicos y por último los de acetato de etilo. En la identificación de metabolitos secundarios pudimos apreciar que el extracto con mayor cantidad de metabolitos secundarios fue en los hexánicos, y el órgano con mayor abundancia de los mismos fue la hoja donde se identificaron terpenos, flavonoides y alcaloides, siendo los glicósidos los que tuvieron un resultado negativo. En el caso de los extractos de Acetato de etilo y de metanol se identificaron muy pocos metabolitos secundarios y en reacciones de bajo porcentaje.

Palabras clave: metabolitos secundarios; muerdagos; plantas medicinales; actividad biológica

REFERENCIAS

[1] Serra, A.; Massing, L.; Bezerra, R.; Veras, R. (2017). Standardization and anti-inflammatory activity of aqueous extract of Psittacanthus plagiophyllus Eichl. (Loranthaceae). Journal of Ethnopharmacology. Brasil pp. 234- 240

[2] Bah, M.; Gutiérrez, D.; Fuentes, R.; Castañeda, R.; Martínez, M. (2011). Chemical Constituents of the Mexican Mistletoe (Psittacanthus calyculatus). Molecules. Querétaro, México. ISSN 1420-3049

[3] Acevedo, J.; García. A.; Martínez, F.; Hernández, C.; Ibarra, M.; Romo, A.; Flores, S.; Velasco, P.; Cespedes, C. (2012). Antihyperglycemic effect and genotoxicity of Psittacanthus calyculatus extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. UNAM, México. Pp. 345- 353

[4] Ibarra-Alvarado, C.; A. Rojas, S. Mendoza, M. Bah, D. M. Gutiérrez, L. Hernández-Sandoval & M. Martínez (2010) Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases, Pharmaceutical Biology, 48:7, 732-739, DOI: 10.3109/13880200903271280

[5] Soberón, J.; Sgariglia, M.; Sampietro, D.; Quiroga, E.; Vattuone, M. (2006). Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology. pp. 1450–1461. ISSN 1364-5072.

OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO XILANOLÍTICO A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM EMPLEANDO COMO SUSTRATO TALLO DE *Eichhornia crassipes*.

González-Martín, N., Téllez-Jurado, A. y *Tovar-Jiménez, X.

Universidad Politécnica de Pachuca. Carr. Pachuca-Cd. Sahagún km 20, Rancho Luna, Ex-Hacienda de Santa Bárbara. Municipio de Zempoala, Hidalgo, Mexico. CP. 42830. Tel. 771547751

*Autor para correspondencia: food_chemistry_xtj@hotmail.com

Área de conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El lirio acuático es una planta hidrofita que se caracteriza por su alta reproductibilidad, es considerada una plaga ya que reduce la cantidad de oxígeno disuelto e impide el paso de luz evitando el crecimiento de la flora y fauna acuática, así mismo sirve como nicho para la reproducción de mosquitos los cuales son vectores de enfermedades. Las alterativas de solución de dichos problemas van desde la erradicación de la planta hasta su control y manejo, sin embargo, los altos costos asociados a la extracción, transporte y disposición final, ocasionan que no se aplique de forma permanente [1]. Por lo que, una opción es el aprovechamiento de la biomasa del lirio cuya composición química incluye proteínas (~10%), lignina (3%) , celulosa (18%) y hemicelulosa (40-55%) [2], la cual pueden ser utilizada para obtener diferentes productos de valor agregado, un ejemplo de esto es la obtención de enzimas sacarificantes por medio de microorganismos, en este sentido, las enzimas xilanolíticas de los hongos filamentosos como *Trichoderma harzianum* son las más importantes desde el punto de vista industrial, debido a que su actividad es mayor que la de las obtenidas de levaduras y bacterias [3]. Por lo antes mencionado, el objetivo del trabajo fue obtener un extracto xilanolítico por medio de fermentación en medio sólido a partir de *Trichoderma harzianum* y tallo de lirio acuático. Se encontró que la mayor actividad enzimática xilanolítica (8.53 UA/gms) se presenta al cabo de 48 h de incubación.

Palabras clave: Actividad xilanolítica; T*richoderma harzianum; Eichhornia crassipes*.

REFERENCIAS

[1] Martínez M., Gómez M.M. 2007. Integrated control of Eichhornia crassipes by using insects and plant pathogens in Mexico. Crop Protection, 26: 1234-1238.

[2 Rezania, S., Ponraj, M., Din, M. F. M., Songip, A. R., Sairan, F. M., & Chelliapan, S. (2015). The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: An overview. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 41, 943-954.

[3] Irfan, M., Nadeem, M., & Syed, Q. (2014). One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from Trichoderma viride-IR05 in solid-state fermentation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 7(3), 317-326.

MONOCARIOTIZACIÓN DE PLEUROTUS ERYNGII POR DEDICARIOTIZACIÓN QUÍMICA Y PRODUCCIÓN DE PROTOPLASTOS.

[1]*Sánchez-Hernández, A., [1]Valenzuela-Cobos, J.D., [2]García-Ornelas, B., [2]Leal-Lara, H., [3]Garín-Aguilar, Ma. E. y [1]Valencia-del Toro, G.

1. Laboratorio de Cultivos Celulares de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. UPIBI, Instituto Politécnico Nacional. Barrio la Laguna s/n Ticomán. Ciudad de México CP 07340, México. 2. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 México D.F. 3.Laboratorio de

*Autor para correspondencia: saha_tm@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El consumo per cápita mundial de hongos comestibles se ha incrementado en un periodo de 15 años (1997-2012) de 1 a 4 kg per capita por año [1]. Actualmente el mercado de los hongos gourmet en nuestro país ha tenido auge, por lo cual son necesarios programas de mejoramiento genético. En la producción de híbridos, la primera etapa se basa en la recuperación de componentes monocarióticos para su posterior hibridación y obtener híbridos con características deseables [2]. La obtención de monocariótes por diferentes métodos, permite obtener material genético inicial para la hibridación posterior. En el presente trabajo se realizó la recuperación de los componentes monocarióticos por dedicariotización química y por produccion de protoplastos de forma satisfactoria. Por ambos métodos se lograron obtener los neohaplontes pertenecientes a los dos tipos de compatibilidad de la cepa Fq de *P. eryngii*. Se observaron diferencias en la tasa de crecimiento de los neohaplontes por los diferentes métodos, lo cual sugiere que la velocidad de crecimiento se ve afectada por el proceso de monocariotización. El material obtenido permitirá realizar apareamientos dirigidos en función del crecimiento micelial para realizar un mejoramiento genético del hongo gourmet *P. eryngii*.

Palabras clave: Mejoramiento genético; Hongos comestibles; monocariotización; dedicariotización; producción de protoplastos.

REFERENCIAS

[1] Royse D. (2014). A global perspective on the high five: Agaricus, Pleurotus, Lentinula, Auricularia & Flammulina. Proceedings of the 8th International Confe- rence on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8) 1: 1-6. World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products ICAR-Direct- orate of Mushroom Research. Mushroom Society of India.

[2] Sonnenberg A., Baars. Hendrickx J. y Kerrigan R. (2005). Breeding mushroom: state of the art. In: Fifth Conference on mushroom biology and mushroom products. Acta Edulis Fungi. Tal et al., Eds. Shangai Xinhua Printing Co., Ltd., 163-173 pp.

BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA FRUCTIFICACIÓN DE *Pleurotus* spp.

*[1]Vargas-Farías, C., [1]Vásquez-Veliz, G.K., [2]Valenzuela-Cobos, J.D., [3]Garín-Aguilar, M.E., y [2]Valencia-del-Toro, G.

1. Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Laboratorio de Propiedades Físico químicas y biológicas de los alimentos, Campus Gustavo Galindo km. 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.
2. Laboratorio de Cultivos Celulares de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. UPIBI, Instituto Politécnico Nacional. Barrio la Laguna s/n Ticomán. Ciudad de México CP 07340, México.
3. Laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av de los Barrios No.1. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla CP 54090. Edo. de México, México.

*Autor para correspondencia: c_vargas14@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN
Se utilizaron 3 cepas del género *Pleurotus* (RX01, RT03, RF014) que se fructificaron en 2 tipos de sustratos: paja de trigo (PT) y aserrín de encino con paja (MR). La cepa RX01 en paja presentó una composición nutricional de 3.15% grasa, 7.58 % fibra cruda, 6.10% cenizas, 21.25% proteína cruda, 69.50% carbohidratos, mientras en MR presentó 2.10% de grasa, 6.97% fibra cruda, 4.15% cenizas, 24.13% proteína cruda, 69.62% carbohidratos. Por otro lado la cepa RT03 en paja presentó una composición química de 1.67% grasa, 7.34% fibra cruda, 5.18% cenizas, 24.84% proteína cruda, 68.31% carbohidratos, mientras en MR presentó 1.89% de grasa, 6.41% fibra cruda, 3.84% cenizas, 25.09% proteína cruda, 69.18% carbohidratos. Finalmente, la cepa RF014 en paja presentó una composición nutricional de 1.52% grasa, 8.24% fibra cruda, 6.09% cenizas, 20.52% proteína cruda, 71.62% carbohidratos, mientras en MR presentó 1.40% de grasa, 7.11% fibra cruda, 7.11% cenizas, 25.40% proteína cruda, 66.09% carbohidratos. Los resultaron obtenidos mostraron que las cepas fructificadas en MR presentaron mejor composición nutricional dado que presentaron mayor contenido de proteína y su bajo contenido de grasas.

Palabras clave: Composición nutricional; hongos comestibles; *Pleurotus*; residuos lignocelulósicos.

INTRODUCCIÓN

Pleurotus spp. es la segunda especie de hongos comestibles con mayor demanda a nivel comercial (Royse, 2014) y por presentar alto valor farmacéutico tales como propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antitumorales (Manzi *et al*., 2001).

En los países en desarrollo aproximadamente el 80 % de estos residuos son destruidos, el 15 % es usado como alimento para animales, el 4,5 % regresa al suelo sin haberse realizado una descomposición previa y el restante 0,5 % se usa como materia prima en industrias como la papelera y aglomerados (Ruilova y Hernández, 2014).

El objetivo de esta investigación fue determinar el mejor residuo lignocelulósico para la fructificación de 3 cepas de *Pleutorus* con el que presenten mejor composición nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

En este estudio se utilizaron 3 cepas de *Pleurotus* spp. (RX01, RT03, RF014).

Composición nutricional de los cuerpos fructíferos

La determinación de grasa, ceniza, fibra cruda, proteína cruda de los cuerpos fructíferos de las 3 cepas de *Pleurotus* se la realizó de acuerdo a lo establecido por la (AOAC, 1984). El contenido de carbohidratos fue determinado por la diferencia (Gaitán- Hernández *et al*., 2006).

Composición química de los sustratos

La determinación de la fibra detergente neutra, fibra detergente ácida y lignina fue determinada de acuerdo a (Van Soest, 1975; Van Soest, 1982). Por otro lado, la hemicelulosa fue determinada por la diferencia de FDN y FDA, y la celulosa por la diferencia de FDA y lignina (Ruilova y Hernández, 2014).

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar la diferencia significativa con un nivel $p < 0,05$, en la composición nutricional de los cuerpos fructíferos y en la composición química de los residuos agroindustriales. Adicional se realizó la prueba de Duncan con $\alpha = 0.05$ para encontrar entre cuales de estas existen diferencias estadísticas. Los análisis se realizaron con el software estadístico Statgraphic ver. 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición nutricional de Pleurotus spp.

Las cepas RX01, RT03 y RF04 fructificadas en sustrato MR presentaron mejor composición nutricional en relación a su alto contenido de proteína y su bajo contenido en grasa, en comparación a su fructificación en paja de trigo (Tabla 1). Gaitán-Hernández *et al*. (2006) presentaron la fructificación de 4 cepas de *Lentinula edodes* en 3 diferentes sustratos (residuos vinícolas, paja de cebada y paja de trigo) mostrando mejor composición nutricional en las cepas fructificadas en paja de cebada.

Tabla 1. *Composición nutricional de Pleurotus spp.* en diferentes sustratos.

Cepas	Sustrato	Proteína cruda (%)	Ceniza (%)	Grasa (%)	Fibra cruda (%)	Carbohidrato (%)
RX01	PT	21.25 ± 0.23^{b}	6.10 ± 0.16^{b}	3.15 ± 0.25^{b}	7.58 ± 0.56^{a}	69.50 ± 1.56^{b}
	MR	24.13 ± 1.56^{a}	4.15 ± 0.03^{b}	2.10 ± 0.06^{c}	6.97 ± 0.08^{a}	69.62 ± 1.97^{b}
RT03	PT	24.84 ± 0.19^{b}	5.18 ± 0.09^{a}	1.67 ± 0.29^{a}	7.34 ± 0.15^{a}	68.31 ± 2.17^{a}
	MR	25.09 ± 0.17^{b}	3.84 ± 0.36^{a}	1.89 ± 0.18^{b}	6.41 ± 0.24^{a}	69.18 ± 1.48^{b}
RF014	PT	20.52 ± 0.09^{a}	6.09 ± 0.00^{b}	1.52 ± 0.08^{a}	8.24 ± 0.06^{b}	71.62 ± 1.12^{c}
	MR	25.40 ± 0.02^{c}	7.11 ± 0.09^{c}	1.40 ± 0.27^{a}	7.91 ± 0.02^{b}	66.09 ± 2.05^{a}

* Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas entre los valores de la composición nutricional de los carpóforos con nivel p <0,05, según la prueba de Duncan, n = 3.

Composición nutricional de los sustratos

La Tabla 2 muestra la degradación que tuvieron los sustratos después de terminar la cosecha de las 3 cepas de la *Pleurotus*. Las cepas fructificadas en PT mostraron una mayor degradación de hemicelulosa, mientras las cepas fructificadas en MR mostraron una mayor degradación de lignina.

Tabla 2. Composición química de los sustratos.

Cepas	Sustrato	Fibra Detergente Ácida (%)	Fibra Detergente Neutra (%)	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)
Control	PT	41.98±0.17^{a}	70.23±0.58^{c}	11.97±0.31^{c}	28.25±0.23^{a}	30.01±0.15^{a}
	MR	53.53±0.32^{d}	79.96±0.49^{c}	13.01±0.22^{c}	26.43±1.09^{c}	40.52±1.28^{d}
RX01	PT	56.16±0.04^{d}	68.23±0.19^{b}	9.02±0.15^{a}	12.07±0.03^{c}	47.14±2.59^{c}
	MR	48.23±0.19^{c}	63.05±0.21^{b}	10.32±0.54^{a}	14.82±0.05^{b}	37.91±2.06^{c}
RT03	PT	53.56±1.19^{c}	67.58±0.12^{b}	10.25±0.16^{b}	14.02±1.15^{b}	43.31±3.17^{b}
	MR	47.05±0.33^{b}	61.43±0.25^{a}	12.64±0.91^{c}	14.38±0.17^{a}	34.41±1.94^{b}
RF014	PT	52.02±0.08^{b}	64.08±0.53^{a}	9.15±0.11^{a}	12.06±0.08^{c}	42.87±1.53^{b}
	MR	43.80±0.29^{a}	58.75±0.32^{a}	11.43±1.02^{b}	14.95±0.18^{b}	32.37±1.19^{a}

* Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas entre los valores de la composición química de los sustratos con nivel p <0,05, según la prueba de Duncan, n = 3.

CONCLUSIONES

Los resultados señalaron que los hongos fructificados en MR presentan mejor composición nutricional que las cepas fructificadas solamente en PT, lo que abre una puerta para darle nuevos usos a la mezclas de diferentes residuos agroindustriales lignocelulósicos en nuevos procesos.

REFERENCIAS

[1] A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists), Officials methods of analysis, 14th ed. Arlington, Virginia, USA, 1984.

[2] R. Gaitán-Hernández, M. Esqueda, A. Gutiérrez, A. Sánchez, M. Beltrán-García, and G, "Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 71, no. 4, pp. 432-439, 2006.

[3] P. Manzi, A. Aguzzi, and L. Pizzoferrato, "Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy," *Food Chemistry*, vol. 73, no. 3, pp. 321-325, 2001.

[4] D.J. Royse, "A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*", in Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), 2014, pp. 1-6.

[5] M. Ruilova, y A. Hernández, "Evaluación de residuos agrícolas para la producción del hongo Pleurotus ostreatus," *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, vol. 48, no. 1, pp. 54-59, 2014.

[6] P.J. Van Soest, "Physio-chemical aspects of fiber digestión", in I. W. McDonald and A. C. I Warner (Eds.), Digestion and Metabolism in the Ruminant. The Univ. New England Publ. Unit., Armidale, Australia, 1975.

[7] P.J. Van Soest, "Nutritional Ecology of the Ruminant", O and B Brooks, Inc., Corvallis, OR, 1982.

MICROESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS.

*Guzmán-Othón, D., Cervantes-Martínez, J.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México. CP 44270.

*Autor para correspondencia: cervantes@ciatej.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Durante el proceso de acidogénesis de vinazas tequileras los microorganismos identificados y estudiados que se han encontrado en mayor cantidad pertenecen al género *Clostridium. Clostridium pasteurianum* y *Clostridium beijerinckii*, son reconocidos como unos de los mayores productores de hidrógeno. Suspensiones celulares de estas bacterias se colocaron sobre un sustrato comercial (Klarite®) activo con nanopartículas de oro. Los espectros Raman se obtuvieron utilizando un microscopio Raman IDRaman micro (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). El haz del láser se enfocó en las células individuales a través del objetivo del microscopio. Se obtuvieron espectros con buena relación señal / ruido. Las dos diferentes bacterias mostraron diferentes espectros. Varios componentes celulares pudieron ser detectados y variados en cantidad de acuerdo a las intensidades de los picos Raman. En comparación con otros métodos para el análisis de células individuales, este método es mucho más rápido, y se obtiene una gran cantidad de información química de las células individuales de una manera no destructiva y no invasiva. Se utilizó un método polinomial de ajuste de curvas para sustraer la fluorescencia de fondo subyacente en los espectros Raman originales. La microscopia Raman mostró ser un método adecuado para estudiar las dos bacterias del genero *Clostridium.*

Palabras clave: *Clostridium Pasteurianum; Clostridium Beijerinckii, Espectroscopia Raman, SERS.*

INTRODUCCIÓN

En México principalmente en el estado de Jalisco, la industria del tequila es conocida mundialmente. Una fábrica típica de tequila produce de 7 a 10 L de vinazas por litro de tequila a 55°G.L. Estas aguas residuales representan para la industria del tequila un grave problema ambiental [1]. En el 2015, se reportó que los microorganismos ácido-tolerantes identificados en la acidogénesis de vinazas de tequila fueron asociados exclusivamente al género *Clostridium*. [2].

Para la identificación de bacterias se emplean métodos tradicionales los cuales precisan de un periodo de incubación significativo, los cuales consumen tiempo y solventes [3]. La espectroscopia Raman presenta una alternativa rápida, libre de reactivos para el análisis de sistemas de biología celular y, en particular, de células vivas individuales. La espectroscopia vibracional moderna se ha convertido en una poderosa herramienta para la investigación de microorganismos. Es una técnica de no contacto basada en el esparcimiento inelástico de la radiación monocromática (láser). Cuando se irradia una muestra, se produce un intercambio de energía entre la luz de excitación y las moléculas de la muestra, lo que da

lugar a un cambio en la frecuencia entre la luz incidente y emitida (Δf) y se denomina desplazamiento Raman, la magnitud de este cambio está determinado por los diversos modos de vibración de las moléculas en la muestra. El desplazamiento Raman se mide en unidades de cm^{-1}. [4]. El espectro Raman resultante es esencialmente una "huella bioquímica", que contiene bandas que representan modos moleculares normales de vibración de todas las moléculas dentro de la región irradiada de la muestra [5]. Sin embargo tiene una señal muy débil y cuando se tienen bajas concentraciones en las muestras es necesario aumentar el límite de detección y para esto se puede aplicar la técnica de superficie amplificada de espectroscopia Raman (SERS por sus siglas en inglés) esta es una poderosa técnica de espectroscopia vibracional que permite detectar la estructura molecular de analitos a muy bajas concentraciones mediante la amplificación de campos electromagnéticos por medio de la excitación de plasmones de superficie localizados [6]. Se ha reportado que al utilizar un microscopio Raman confocal y usando excitación a 632.8 nm. se obtuvieron espectros Raman convencionales de células individuales de la bacteria anaerobia *Clostridium beijerinckii*. Ellos reportaron algunas atribuciones tentativas de la mayoría de las bandas Raman correspondientes a grupos funcionales de los constituyentes principales de las células microbianas, proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos [7]. Por lo tanto, nuestro objetivo es combinar la microscopia Raman y SERS para caracterizar espectralmente las bacterias anaeróbicas *Clostridium pasteurianum y Clostridium beijerinckii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias anaerobias

Se trabajó con dos tipos de bacterias anaerobias *C. Pasteurianum* ATCC 6013 y *C. Beijerinckii* ATCC 8260, las cuales se adquirieron de la Organización mundial de recursos biológicos y estándares ATCC.

Activación de cepas ATCC

Para la activación de las cepas ATCC se utilizó una cámara de anaerobiosis, medio de cultivo clostridial reforzado, y bolsas para producir anaerobiosis. Primero se prepararon alícuotas de medio TSB + 15% de glicerol para criopreservación. Y a la par se prepararon alícuotas de medio de leche descremada para criopreservación. Se activaron los dos tipos de cepas en las alícuotas para preservar a -80°C, seguido de esto a las 24 horas se inocularon en medio solido de clostridial reforzado, para estudiar su morfología, seguido de tinción Gram, y tinción de esporas.

Preparación de bacterias para medición con espectroscopia Raman

Una vez pasado el tiempo de incubación de 24 horas para los dos tipos de cepas ATCC, en medio liquido clostridial reforzado, se hicieron 3 lavado con agua inyectable y se resuspendió en agua inyectable para tomar una muestra en suspensión para posteriormente colocar 0.1µl en un sustrato comercial Klarite y medir con un microscopio Raman.

Sustratos Klarite®

Los sustratos de Klarite (Renishaw Diagnostics) proporcionan una solución para el análisis molecular a nivel de trazas utilizando la Espectroscopia Raman amplificada de Superficie (SERS). Los sustratos SERS de Klarite consisten en pirámides grabadas de 1,5 µm de diámetro con oro rugoso (tamaño característico ~ 20 nm) [8].

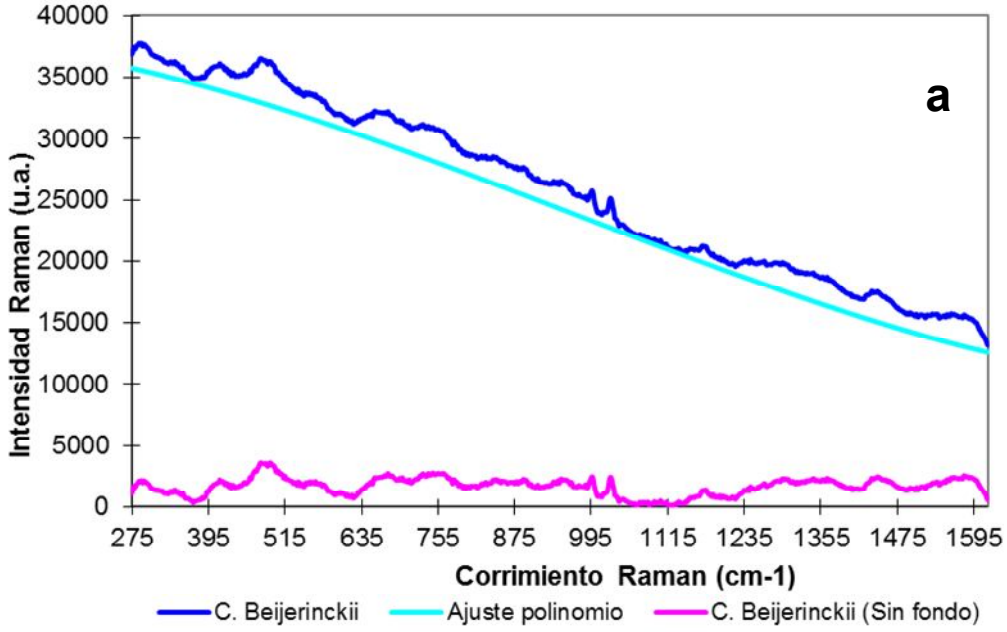
Microscopia Raman

Los espectros Raman de las bacterias estudiadas fueron obtenidos usando un microscopio Raman (IDRaman, Ocean Optics Inc., Dunedin FL), el espectrómetro está acoplado a un microscopio óptico equipado con iluminación de reflexión. La excitación del esparcimiento Raman es con un láser de longitud de onda de 785 nm y con potencia de salida máxima de 70 mW. El haz del láser fue enfocado sobre las células individuales por medio de objetivos de 40X y 80X. Los espectros Raman de células individuales se pudieron registrar con buena relación señal/ruido con tiempos de integración de 5 a 30 s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1a muestra el espectro Raman original y sin fluorescencia de fondo de la bacteria anaeróbica *Clostridium beijerinckii*, así como el ajuste polinomial de tercer grado para eliminar la fluorescencia de fondo. La figura 1b muestra el espectro Raman de la bacteria sin fluorescencia de fondo. En este espectro es posible identificar algunos picos Raman bien definidos como por ejemplo a 406, 784, 812, 996, 1025, 1250, 1268 y 1300 cm^{-1}.

En la figura 2 se muestra el espectro Raman original y sin fluorescencia de fondo de la bacteria anaeróbica C. *Pasteurianum*. así como el ajuste polinomial de quinto grado para eliminar la fluorescencia de fondo. También se muestran algunas asignaciones de sus picos al contenido celular.


a
Intensidad Raman (u.a.)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
275 395 515 635 755 875 995 1115 1235 1355 1475 1595
Corrimiento Raman (cm-1)
C. Beijerinckii
Ajuste polinomio
C. Beijerinckii (Sin fondo)

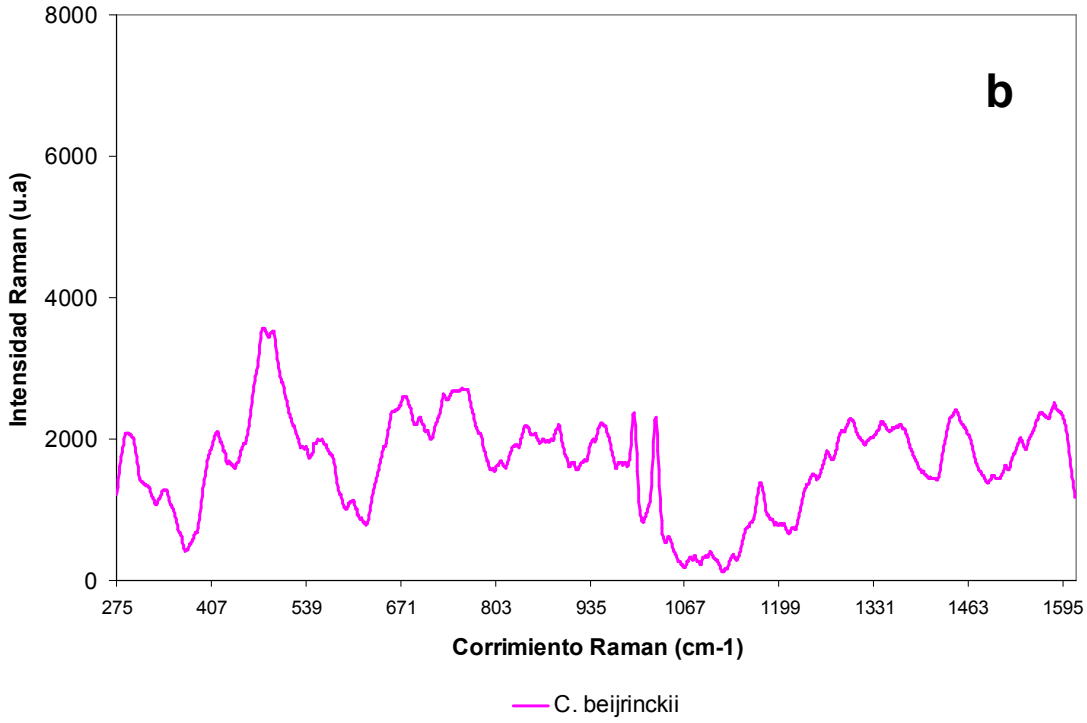

b
Intensidad Raman (u.a)
8000
6000
4000
2000
0
275 407 539 671 803 935 1067 1199 1331 1463 1595
Corrimiento Raman (cm-1)
C. beijrinckii

Figura 1. a) Corrección de la fluorescencia de fondo de *Clostridium beijerinckii.* b) Espectro Raman sin fondo

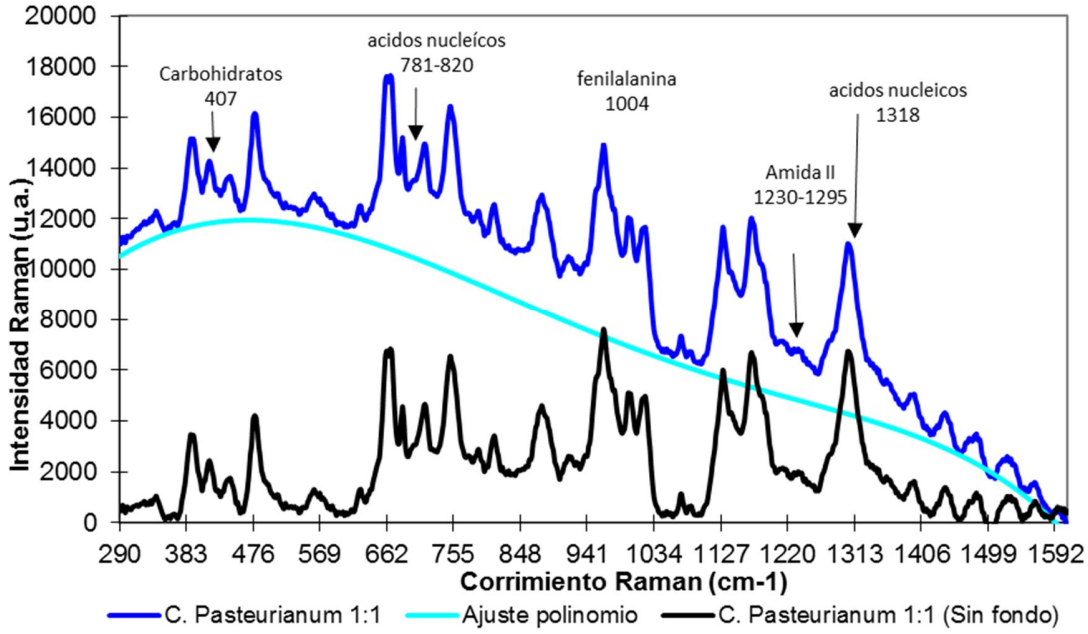


Figura 2. Corrección de la fluorescencia de fondo de la dilución 1:1 de *C. Pasteurianum*

El espectro Raman de bacterias Clostridium consiste de bandas que representan el contenido celular principalmente proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Por ejemplo el pico localizado a 407 cm^{-1} fue asignado para carbohidratos, los picos a 781-820 y 1318 cm^{-1} fueron asignados para ácidos nucleicos, y los picos a 1004 y 1230-1295 cm^{-1} fueron asignados para proteínas [7].

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la mejor técnica rápida para la caracterización espectral e identificación de bacterias *Clostridium Pasteurianum y Clostridium Beijerinckii*, es la combinación de la técnica SERS con la microscopia Raman, ya que proporciona información espectral de grupos funcionales de los constituyentes principales de células microbiana, tales como, proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

REFERENCIAS

[1] López-López, Alberto, et al. "Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes." Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, vol. 9, no. 2, 2010, pp. 109–116.

[2] Marino-Marmolejo, E N, et al. "Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with Clostridium predominance." SpringerPlus, vol. 4, no. 1, 2015.
[3] Kong, Kenny, et al. "Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-Vitro biofluid assays to in-Vivo cancer detection." Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 89, 2015, pp. 121–134.
[4] K, Maquelin, et al."Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy." Journal of Microbiological Methods. Vol. 51, no. 3, 2002, pp. 255-271.
[5] Glasstone, Samuel. "Quantum Chemistry (Eyring, Henry; Walter, John; Kimball, George E.)." Journal of Chemical Education, vol. 21, no. 8, 1944, pp. 415.
[6] Kneipp, Janina, et al. "SERS—a single-Molecule and nanoscale tool for bioanalytics." Chemical Society Reviews, vol. 37, no. 5, 2008, p. 1052.
[7] Schuster, K. Christian, et al. "Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy." Analytical Chemistry, vol. 72, no. 22, 2000, pp. 5529–5534.
[8] Renishaw Diagnostics: www.renishawdiagnostics.com

ESTUDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE HOJAS DE MORINGA.

García-García, F.J., Montañez-Soto, J.L., Angoa-Pérez, M.V., Mena-Violante, H., Oyoque-Salcedo, G. y *Oregel-Zamudio, E.

Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-Michoacán, Justo Sierra 28, Centro, Jiquilpan, Michoacán, C.P. 59510, México.

*Autor para correspondencia: eoregel@ipn.mx

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

La Moringa oleífera es un cultivo originario del nordeste de la india, actualmente se encuentra ampliamente distribuido por los trópicos, en los últimos años se ha cultivado en diversos lugares de México, uno de ellos en la región Ciénega de Michoacán. Este árbol se le atribuye múltiples propiedades debido a su contenido de compuestos nutricionales como proteínas, vitaminas y minerales, sin embargo, el estudio con respecto a los compuestos volátiles o químicos presentes en su material vegetal son limitados. En este estudio se analizaron extractos de Moringa oleífera elaborados a partir de hojas secas trituradas, se utilizó un método de extracción por percolación tipo soxhlet con hexano como solvente y se analizaron de forma cualitativa por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Se encontraron quince compuestos volátiles bien definidos con valores por encima de 800 unidades de coincidencia con la base de datos de referencia. Los cuatro principales compuestos volátiles encontrados fueron el 3-Methyl-2-butenal, Ciclopentano, metíl, Tetratriacontane y Tetracosano con áreas relativas de 24.47%,19.59%, 16.36 y 10.04% respectivamente.

Palabras clave: Moringa oleífera; Volátiles; Extractos; Cromatografía de gases; Espectrometría de masas.

BIOINFORMATICA DE PROTEÍNAS REGENERADORAS DE TEJIDOS.

Villalobos-Ornelas, A. y *Brena-Becerril, A.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 carretera Tlajomulco-Santa Fé, Lomas de Tejeda, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

El *Ambystoma mexicanum*, mejor conocido como axolote o ajolote, podría ser la clave para que, aquellas personas que han perdido alguna extremidad, puedan recuperarla mediante la regeneración de tejidos [2].La regeneración de tejidos a partir de seres complejos se ha estudiado últimamente en los países desarrollados y en el Laboratorio Nacional De Genómica Para La Biodiversidad (LANGEBIO) que utiliza especies endémicas de México. En las investigaciones han concluido que a partir de una proteína de *Ambystoma mexicanum* (ajolote mexicano) es con la que se puede regenerar tejidos. También se han utilizado sus variantes debido a la gran similitud que tienen. Se utilizaron programas informáticos, primero en National Center for Biotechnology Information (NCBI) se localizaron proteínas con alto porcentaje (mayor al 85%) de que son idénticas, después se utilizó el programa Clustal X, para alinear las secuencias e identificar las regiones idénticas, se generó un árbol y en el programa Mega 4 se editó el árbol obtenido en Clustal X para definir la distancia evolutiva de cada proteína. Se encontraron secuencias homologas de diversas proteínas de organismos diferentes. El proyecto se realizó para la asignatura de bioinformática en los laboratorios de cómputo de la Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, en el cuatrimestre correspondiente a los meses de Mayo a Agosto. Como fuente alternativa y/o complementaria de *Ambystoma mexicanum* se propone encontrar proteínas que cumplan con la misma función de regeneración y que sea compatible con tejidos de organismos más complejos, se buscará en seres más pequeños y adaptables a cualquier tipo de ambiente. Con las proteínas que resulten con la misma función, realizaran pruebas para verificar que en realidad puedan regenerar y sean adaptables al ser humano, siendo un tema muy prometedor para la medicina regenerativa.

Palabras clave: Regeneración de tejido; proteína regeneradora; ajolote.

REFERENCIAS

[1] Cruz-Ramírez Alfredo Molecular and Developmental Complexity (2014) LANGEBIO.

[2] Godwin James, Instituto de Medicina Regenerativa (NIDS) de la Universidad de Monash, Australia (2013) Revista Proceedings de la academia nacional de ciencias (USA).

[3] Bryant, D.M., Sousounis, K., Farkas, J.E., Bryant S., Thao, N., Guzikowski, A.R., Monaghan, J.R., Levin, M., Whited, J.L. Repeated removal of developing limb buds permanently reduces appendage size in the highly-regenerative axolotl. Abril 2017 US National Library of Medicine

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN EXTRACTO DE SEMILLA DE AGUACATE *(Persea americana MILL*) EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.

[*]Urue-Corral, A., Martínez-Velázquez, M., Villanueva-Rodríguez, S., Ramos-Jerz, R., Padilla-Camberos, E. Cortes-Álvarez, C.R., y Bolaños-Carrillo, M.A.

1 Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC. Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal C.P. 44270, Guadalajara México.
2 Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jal México.

*Autor para correspondencia: adriana_urue15@hotmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN
Los alimentos funcionales son benéficos para la salud debido a sus propiedades nutracéuticas así como por su valor nutritivo convencional. Un ejemplo de este tipo de alimentos es el aguacate (*Persea americana*), el cual según estudios químicos previos, posee compuestos con características funcionales importantes en el tratamiento o prevención de enfermedades de importancia nacional. Tomando como base esto, se realizó la elaboración de extractos a partir del hueso de aguacate con el fin de identificar las posibles actividades biológicas útiles en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades. Para estudiar la posible actividad antineoplásica de los extractos de la semilla de aguacate, se realizaron ensayos citotóxicos *in vitro* en un panel de líneas celulares de cáncer. El extracto de éter de petróleo produjo una disminución en la viabilidad, dependiente de la concentración. Los resultados sugieren un potencial aprovechamiento del fruto, con la posibilidad de ampliar sus usos en tratamientos y prevención de enfermedades crónico degenerativas.

Palabras clave: Aguacate, extracto, citotoxicidad, cáncer

INTRODUCCIÓN

En México existe una variedad de alimentos con propiedades útiles en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Estos alimentos funcionales son benéficos para la salud debido a sus propiedades nutracéuticas así como por su valor nutritivo convencional.[1] Un ejemplo de este tipo de alimentos es el aguacate (Persea americana), el cual según estudios químicos previos, posee compuestos con características funcionales importantes en el tratamiento o prevención de enfermedades de importancia nacional.[1,2] Destacando también que es uno de los cultivos más importantes en México, ya que es un producto de alta producción y exportación. Cabe mencionar que las semillas de aguacate son desechadas y desaprovechadas generando una fuente de contaminación. Éstas se pueden procesar, y así, convertirse en una fuente potencial para complementos alimenticios por los metabolitos presentes en ellos, de los cuales recientemente se ha motivado su estudio como fuente de interés para la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia.

Tomando como base esto, en el presente trabajo se realizó la elaboración de extractos a partir del hueso de aguacate con el fin de identificar las posibles actividades biológicas útiles en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades. De esta manera se evaluaron las actividades citotóxica de dichos extractos para contribuir al desarrollo del conocimiento y aplicación de extractos de origen natural para su uso en la salud humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una descripción detallada de la extracción de éter de petróleo a partir de semillas de aguacate se puede encontrar en Ramos Jerz[3]. La línea celular de cáncer cervicouterino HeLa, células de adenocarcinoma de próstata PC.3, y la línea celular de cáncer de pulmón A549 se mantuvieron como una monocapa en DMEM que contenía suero fetal bovino al 10%, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2. Las células se sembraron en placas de 96 pozos durante 24 horas, a continuación, se añadió MTT a cada uno, y después de una incubación de 4 horas, se leyó a 590 nm. El análisis se realizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto de éter de petróleo a partir de la semilla de aguacate se encontró que es altamente citotóxico contra un panel de líneas celulares de cáncer, los compuestos lipofilicos tales como las acetogeninas podrían ser responsables de estos efectos, la semilla de aguacate por lo tanto podría representar una fuente de nuevos agentes antitumorales bioactivos.

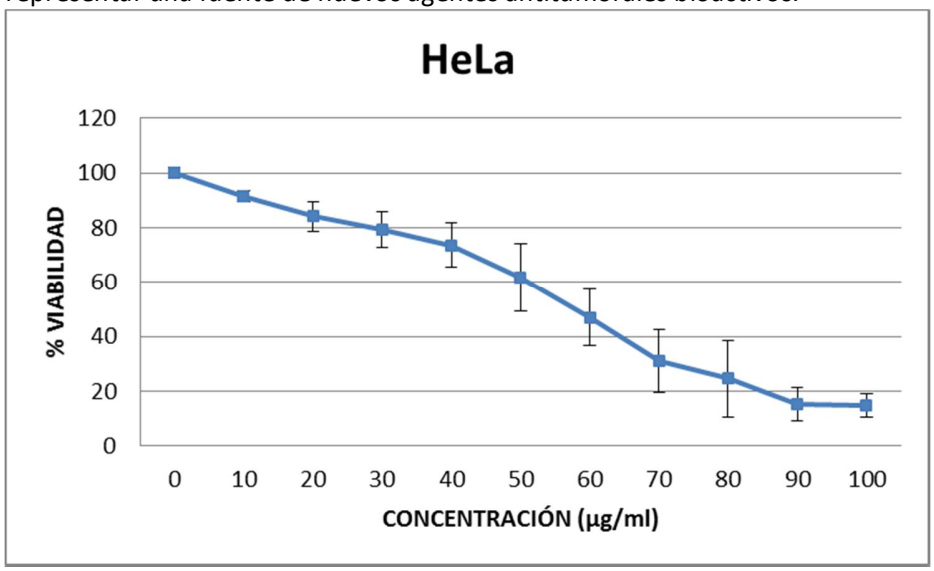


Figure 1. Efecto citotóxico del extracto de semillas de aguacate en la línea celular HeLa.

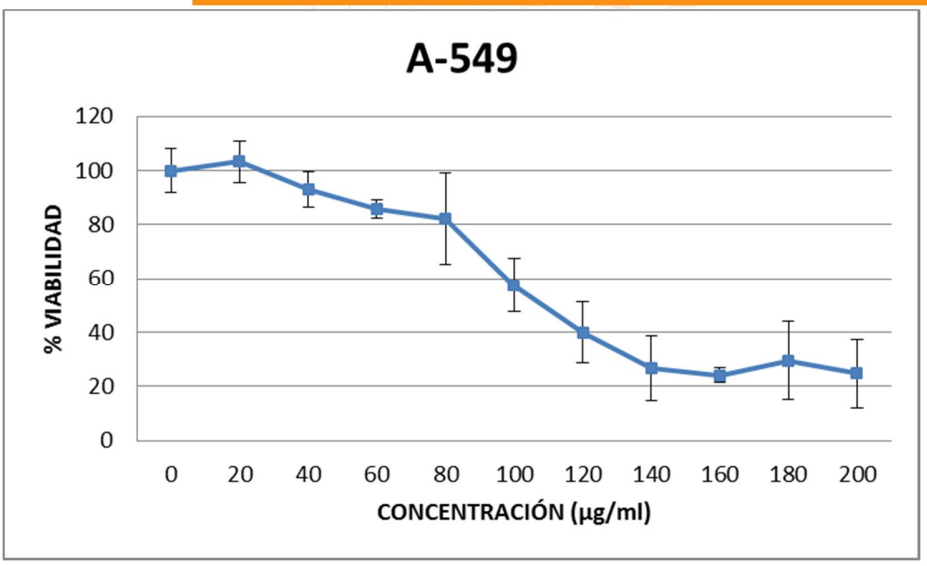


Figure 2. Efecto citotóxico del extracto de semilla de aguacate en la línea celular A-549.

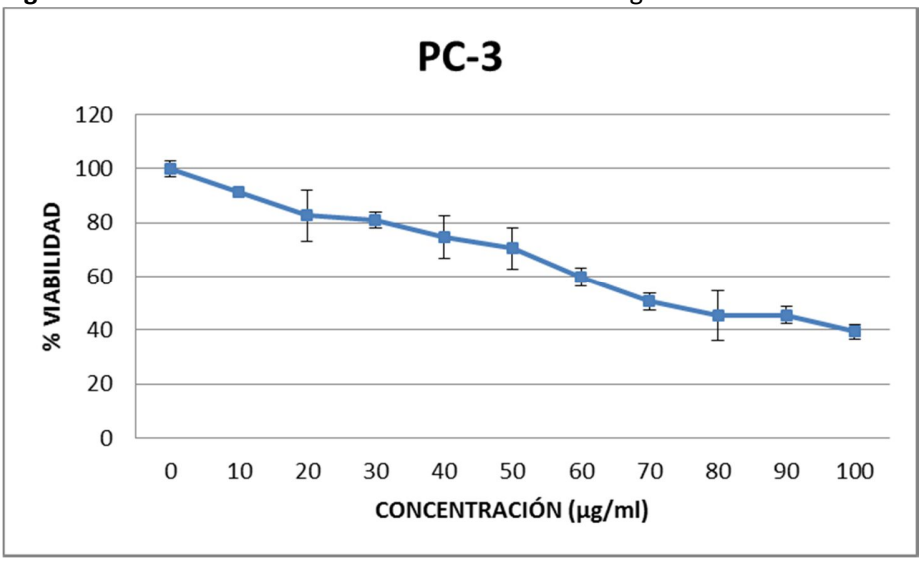


Figure 3. Efecto citotóxico del extracto de semilla de aguacate en la línea celular PC-3.

CONCLUSIONES

El extracto de éter de petróleo a partir de la semilla de aguacate se encontró que es altamente citotóxico contra un panel de líneas celulares de cáncer, los compuestos lipofilicos tales como las acetogeninas podrían ser responsables de estos efectos, la semilla de aguacate por lo tanto podría representar una fuente de nuevos agentes antitumorales bioactivos.

REFERENCES

[1] Khan et al., Antioxidative potential *Duranta* repens (linn.) fruits against H_2O_2 induced cell death in vitro Afr J Tradit Complement Altern Med. 10(3):436-441, 2013

[2] Dabas D., Shegog R.M. Ziegler G.R. and Lambert J.D. 2013 Avocado (*Persea americana)* seed as a source of bioactive phytochemicals Current Pharmaceutical Design. 19: 6133-6140. 2013

[3] Ramos-Jerz M.R. Phytochemical analysis of avocado seeds (*Persea americana* Mill., c.v. *Hass.* Ed. Cuvillier Verlag. Göttingen, 319 pp. ISBN 978-3-86727-389-3. 2007

OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS LIBRES DE SOLVENTES ORGANICOS DE *P. Serotina* VAR. CAPULI.

García-Ruelas, M.A., Chávez-Rivera, R. y Ortiz-Alvarado, R.

Cuerpo Académico de Fisiopatologías-211, Fac. de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor para correspondencia: terezo12@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

México es un territorio mega diverso, el cual ha permitido el desarrollo de diferentes microclimas, los cuales han favorecido el desarrollo de diversas especies agroindustriales que han tenido un éxito relativo para posicionarse a nivel mundial, como por ejemplo *P. americana* var. Hass y recientemente la frambuesa y la zarzamora, las cuales pertenecen a la género Rubus spp. y son parte de la familia de las Rosáceas, que incluyen a otras especies, nativas de México, como por ejemplo el capulín (*Prunus serotina* var. capuli), este se han cultivado de manera empírica, desde la época pre hispánica hasta nuestros días. Así *P. serotina* var. capulí al ser parte de la Rosáceas, se ha documentado que posee ácidos grasos similares a los de otras rosáceas, como la frambuesa y la zarzamora, donde el perfil de tipo poliinsaturados, destacan por perfil cualitativo, el ácido linoleico, linolenico y oleico. Por lo tanto el presente trabajo establece las condiciones de extracción, rendimiento y tipo de ácidos grasos obtenidos de manera libre de solventes orgánicos de especies nativas de las Rosáceas entre las que destacan al *P. serotina* var. capulí. Los resultados han permitido establecer que *P. serotina* var. capuli presenta un rendimiento del 28.2% de la fracción lipídica (aceite) respecto al peso seco proveniente de la semilla en comparación con las semillas de la frambuesa y la zarzamora que presentan un rendimiento del 15.40% de fracción hidrofóbica respecto al peso seco. El proceso de extracción se basó en el uso de microondas y como medio el agua libre de iones, seguido de un proceso de congelamiento a -25ºC y procesos de centrifugación a 7500G. Los ácidos grasos obtenidos se caracterizaron por cromatografía de gases. Estableciendo un proceso de extracción de ácido grasos poliinsaturados de *P. serotina* var. capuli.

Palabras clave: Rosáceas; ácidos grasos poliinsaturados; *P. serotina* var. Capuli.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos insaturados de tipo C:18 son indispensables para una dieta humana diversa y equilibrada. En la actualidad, el acceso a diversas fuentes de ácidos grasos de tipo poliinsaturados es apremiante para la prevención de enfermedades, como la obesidad y sus complicaciones. En el estado de Michoacán, el municipio de Ziracuaretiro es el segundo productor de frutos del genero *Rubus* con alto valor comercial y potencial nutrimental; la comercialización se realiza preferentemente en fresco, dejando volúmenes de producto sin comercializar, por no cumplir con los estándares de tamaño y turgencia. Generando pérdidas para los productores. Este trabajo tiene por objetivo, obtener datos que permitan caracterizar el rendimiento y el tipo de ácidos grasos poliinsaturados de tipo C:18, obtenidos

de los frutos del genero *Rubus* no comercializados y generar una fuente alternativa de ácidos grasos insaturados necesarios en la dieta humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectarán muestras de capulín (*Prunus serotina var. capulí*) provenientes de las zonas productoras que pertenecen a los municipios de Michoacán, Guanajuato y Estado de México. Se transportaran los frutos en cajas con aislamiento térmico, a la ciudad Morelia, y se almacenaran a una temperatura promedio de 8°C, toda la noche. Al día siguiente se procesaran los frutos en centrifuga de canasta, por un espacio de 10 minutos a 2000 g, a temperatura ambiente. Se recuperará el sobrenadante y se guardó a -80°C.

Sólidos.

El residuo sólido se recupera y se someterá por un espacio de 18 horas a un tratamiento térmico, por luz directa, de una lámpara incandescente de 150 watts de potencia, sobre una superficie de convección, acero grado alimenticio de 3mm de espesor. Al término se obtuvo un residuo sólido el cual fue tamizado, liberando las semillas del fruto de zarzamora. Las semillas de zarzamora se sometieron a un molido en mortero, para la extracción por solventes en equipo Soxhlet.

Extracción Soxhlet:

Las semillas molidas, en peso seco, se sometieron a extracción por solventes no polares, en equipo Soxhlet, realizando tres extracciones con éter etílico (Meyer), y cinco extracciones con pentano, utilizando 3 gramos del material biológico en cada extracción.

Extracción por microondas.

Las semillas molidas, en peso seco, se sometieron a un tratamiento térmico por inducción, en horno de microondas bajo el siguiente protocolo: en cada extracción se sutilizaron 3 gramos de material molido al cual se le agrego 20 mL de agua bidestilada, y se dejó en reposo por una noche a una temperatura de 8°C, a la mañana siguiente, el vaso de precipitados conteniendo el material molido con el agua se dejó en reposo por un hora un a temperatura ambiente y se llevó a cabo el tratamiento en horno de microondas, con una potencia de 0.25-0.33 Kwatts/hrs. Por un espacio de 20 minutos, obteniendo una temperatura de la mezcla de 88-90°C ±1°C.

Centrifugación.

El residuo se colecto y se transfirió a tubos de polipropileno de 1.5 mL de capacidad (Eppendorf) y sometieron a centrifugación por espacio de 15 minutos a 6000g a una temperatura de 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos limpios de polipropileno de 1.5 mL de capacidad. El sobrenadante de sometió a refrigeración durante 18 horas a una temperatura de 4 a 8°C, los tubos se sometieron a centrifugación a temperatura ambiente por un espacio de 10 minutos y 3000 g. El contenido oleoso se colecto por aspiración con punta con filtro y se guardó en viales de rosca de 2 mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados:

Las semillas de los frutos de zarzamora y capulín provenientes de residuos sólidos, son una fuente de ácidos grasos de tipo, C:18 poliinsaturados, como son el ácido linoleico y linolenico, utilizando tratamiento por microondas en cinco diferentes extracciones, se obtiene un rendimiento del 16.83% y

una desviación estándar de ±1.58, de cinco extracciones diferentes por éter etílico se obtiene un rendimiento promedio del 15.18% y ±1.44 de desviación estándar y del 12.40% con una desviación estándar de ± 1.08 con pentano en cinco extracciones diferentes, Ver Tabla No.1; por lo que el tratamiento por microondas, es una alternativa metodológica para la obtención de grasos de alto valor comercial, sin la implicación del uso de solventes químicos de tipo no polar, adicionalmente abre la posibilidad de poder obtener ácidos grasos de tipo poliinsaturados de tipo virgen, con el uso de tecnologías emergentes o alternativas, como la aquí mostrada Figura No.1.

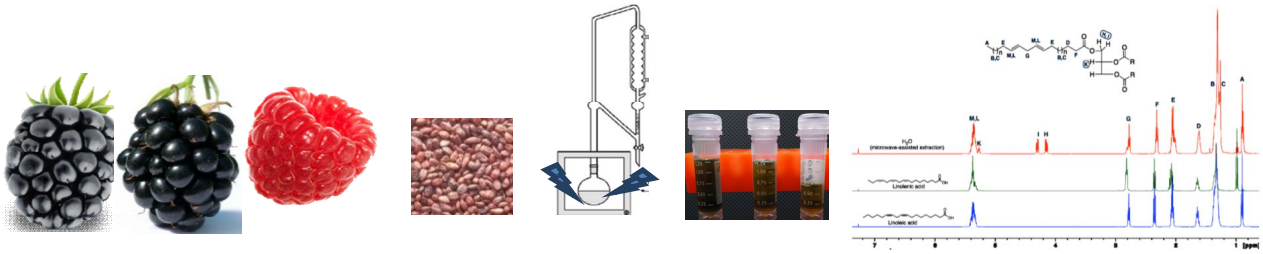
Tabla No. 1.- Porcentaje de rendimiento en la extracción de aceite de la semilla de *Rubus fruticosus y P. serótina var. capulí.*

Tratamiento de extracción	Microondas	Éter etílico	Pentano
Rendimiento en Porcentaje en Peso Seco	16.83	15.18%	12.40%
Desviación Estándar	±1.58	±1.44	± 1.08

.



Figura No. 1.- Extractos oleosos provenientes de la Semilla de Zarzamora variedad Tuppy (Rubus fruticosus) y *Prunus serótina var. capuli*. Por tratamiento extractivos por microondas A), éter etílico B) y pentano C).



Metodología de trabajo Propuesta Figura No.2.

Discusión

La propuesta de la nueva tecnología del aceite y pasta de zarzamora y está fundamentada en dos efectos de las ondas electromagnéticas sobre el residuo agroalimentario del fruto zarzamora: 1)

Rompimiento de membranas y paredes de las células que contienen el aceite. 2) La inactivación de enzimas que catalizan el oscurecimiento y otras reacciones oxidativas. Al ser el aceite transparente a las microondas conservan las propiedades nutraceúticas de estos productos, al no contener restos de solventes químicos (Moreno, et al., 2003, Reddy et al., 2012, Zia et al., 2014). Esto es un efecto específico que se determinó en la aplicación de microondas, que minimiza el deterioro de los nutraceúticos y ácidos grasos esenciales de la semilla de zarzamora, obteniendo dos productos: el aceite extra virgen y una pasta reducida en calorías que puede utilizarse para composteo (Schott, et al., 2013).

De esta forma, esta tecnología tiene tres ventajas: 1) Es menos contaminante al utilizar la pasta de alta calidad y no emplear disolventes orgánicos o soluciones acuosas que producen aguas residuales y, 2) Conserva las propiedades nutraceúticas del aguacate en productos de alta calidad, como son los ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolenico, (Reddy et al., 2012) y 3) como se puede observar el uso de microondas y centrifugación permite obtener un rendimiento superior a los métodos de extracción por solventes orgánicos, como se aprecia y se compara respecto al porcentaje de aceite obtenido por el método por microondas respecto a los otros métodos químicos observado en la Tabla No.1.

El proceso es flexible al poder ser aplicado en un esquema por lotes, en una planta modular, en procesos continuos. Incluye la posibilidad de darle al producto las características tales para obtener una pasta congelada o deshidratada. Los nutraceúticos tales como la vitamina E, fitoesterol, luteína y clorofilas son sustancias benéficas para la salud, que se encuentran solubles en el aceite extra virgen de aguacate obtenido por la tecnología objeto de esta invención; lo que hace al producto rico en estos ácidos grasos poliinsaturados, en comparación con los aceites existentes en el mercado. En el presente trabajo, se presenta un mapa de ruta crítico referente a la utilización de la semilla de zarzamora, proveniente de los residuos sólidos generados, en la agroindustria de este sistema producto, para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de alto valor comercial, por medio de tecnologías alternativas, comparando con los sistemas tradicionales de extracción química, se platea un uso a los deshecho solidos agroindustriales.

CONCLUSIONES

Por lo que el presente trabajo concluye que la semilla del fruto de la familia *Rosaceas* es una materia prima de importancia nutrimental mayor para la obtención potencial de ácidos grasos poliinsaturados de tipo C:18 lo que podría dar una alternativa de comercialización a los productores de este sistema producto.

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, proyecto financiado en 2017.

REFERENCIAS

[1] Akanda M.J., Sarker M.Z., Ferdosh S., Manap M.Y., Ab Rahman N.N., Ab Kadir M.O. (2012). Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources. *Molecules*. 10;17 (2):1764-94.

[2] Boeing J.S., Barizão E.O., Silva B.C., Montanher P.F., de Cinque Almeida V., [3] Visentainer J.V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant

capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem. Cent J.* 22;8(1):48.

[3] Bushman B.S., Phillips B., Isbell T. (2004). Chemical composition of caneberry (Rubus spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *J Agric Food Chem*. 52(26):7982-7.

[4] do Nascimento Nunes MC, Nicometo M, Emond JP, Melis RB, Uysal I. (2014). Improvement in fresh fruit and vegetable logistics quality: berry logistics field studies. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 5; 372(2017):20130307.

[5] Hassimotto N.M., Pinto Mda. S., Lajolo F.M. (2008). Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (Rubus fruticosus L.) juices with and without defatted milk. J Agric. Food Chem. 56(24):11727-33.
Matthäus B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J. Agric. Food Chem. 50(12):3444-52.

[6] Moreno A.O., Dorantes L., Galíndez J., Guzmán R.I. (2003). Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana Mill*.) oil. J. *Agric. Food Chem*. 51(8):2216-21.

[7] Reddy M., Moodley R., Jonnalagadda S.B. (2012). Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana Mill*.) oil--effect of extraction methods. *J Environ. Sci. Health. B.* 47(6):529-37.

[8] Schott A.B., Vukicevic S., Bohn I., Andersson T. (2013). Potentials for food waste minimization and effects on potential biogas production through anaerobic digestion. *Waste Manag Res*. 31(8):811-9.

[9] Vitaglione P., Savarese M., Paduano A., Scalfi L., Fogliano V., Sacchi R. (2013). Healthy virgin olive oil: a matter of bitterness. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 54(8):2216-21.

[10] Zia-Ul-Haq M., Riaz M., De Feo V., Jaafar H.Z ., Moga M. (2014). *Rubus fruticosus L.*: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules.*

OXIDACIÓN BIOLÓGICA DE SULFURO DE HIDRÓGENO Y SULFATO FERROSO MEDIANTE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO.

Vega-Barriga, C.G., Becerril-Varela, K. y *Guerrero-Barajas, C.

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

*Autor para correspondencia: cguerrrobarajas@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El sulfuro de hidrógeno ha sido reconocido como un problema importante por las emisiones producidas por industrias como la papelera, la de curtidumbres y plantas de productos petroquímicos. En la actualidad, se han utilizado diferentes métodos fisicoquímicos que por sus altos requerimientos químicos y su tratamiento posterior representan una alternativa de muy alto costo. En contraste con esto, los métodos biológicos representan una alternativa económica y eficiente al operar en condiciones de temperatura moderada y presión atmosférica. Los biofiltros se han propuesto como una alternativa prometedora para el tratamiento de emisiones de sulfuro de hidrogeno y en la reducción de compuestos de sulfato. En el caso de los sistemas de remoción del sulfuro de hidrogeno, se presentan reacciones biológicas, oxidación de suministros de energía para la célula y producción de compuestos innocuos. El azufre elemental procedente de estos microorganismos puede almacenarse en glóbulos de azufre, situados dentro o fuera de la célula. Se han utilizado una amplia gama de microorganismos para la remoción de sulfuros entre los cuales se encuentran: *Thiobacillus thioparus, Hipomocrobium* y *Xanthonomas, Mehylophaga sulfidovorans, y Microbacterium sp. y Pseudomonas.* Estos microorganismos presentan la oxidación biológica del sulfuro de hidrogeno y también del sulfato ferroso con el oxígeno como aceptor de electrones, el ion ferroso es una especie soluble y estable a pH extremadamente bajo o condiciones anaerobias. En condiciones aerobias y pH moderado el ion ferroso se oxida espontáneamente a la forma férrica (Fe+3). La eliminación biológica del sulfuro se lleva a cabo mediante una configuración de lecho fluidizado, en la cual se han encontrado enumerarles ventajas en comparación con reactores con biomasa en suspensión, estas ventajas son: bajo tiempo de retención hidráulico, alta concentración de biomasa, menores costos de inversión y espacio; añadido a esto, la inmovilización de los microorganismos al medio de soporte depende de la porosidad y la rugosidad de este. Es por ello que se estableció en el biorreactor un sistema de inmovilización (IBR), contando como medio de soporte con el tezontle. El tezontle presenta una elevada área específica y alta afinidad bacteriana, elevada velocidad de colonización, resistencia al ataque microbiano por ser un material inorgánico, termo estabilidad, porosidad mayor al 75%, resistencia a la abrasión, disponibilidad en el mercado y bajo costo. Representando un material ideal de soporte.

Palabras clave: Biofiltro; sulfuro de hidrógeno; azufre.

REFERENCIAS

[1] OYAZUN AND ARANCIBA."BIOFITRATION OF HIGH CONCENTRATION OF HYDROGEN SULPHIDE USING THIOBACILLUS THIOPARUS", SCHOOL OF BEOCHIMICAL ENGEENERING,CATHOLIC UNIVERSITY OF VALPARAISO,CHILE ENERO 2002.

[2] MIDHA AND JHA, "SULFIDE OXIDATION IN FLUIDZED BED BIOREACTOR USING NYLON SUPPORT MATERIAL", DEPARTAMENT OF CHEMICAL ENGINEERING, NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, INDIA MAY.2011adores. CONABIO. Biodiversitas, 85: 1-5.

ANÁLISIS DE LA RESPIRACIÓN CELULAR EN LEVADURAS NO CONVENCIONALES MEDIANTE UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS.

[1]Alcántar-Calderón, U.Y., [1]Salazar-Torres, J.A., [2]Madrigal-Pérez, L.A., [1]Garambullo-Peña, T.I., y Juan Carlos [1*]González-Hernández, J.C.

1. Laboratorio de Bioquímica del Depto. de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia-Tecnológico Nacional de México. C.P. 58120. Morelia, Mich. México.
2. Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo-Tecnológico Nacional de México. Av. Ing. Carlos Rojas Gutiérrez # 2120.C. Hidalgo, Michoacán. C.P. 61100. México.

*Autor para correspondencia: jcgh1974@yahoo.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN
El trabajo muestra las mediciones de parámetros de pH, K y Na realizados a levaduras *Saccharomyces cerevisiae, Pichia kluyveri e Issatchenkia terricola* con glucosa, glicerol y etanol como fuente de carbono, mediante un sistema de adquisición de datos (SAD) multisensorial que permite procesar, graficar y guardar los datos generados en tiempo real para su posterior análisis. Se comprobó que con concentraciónes de 10 µM de FCCP y 2mM de KCN se puede promover e inhibir la respiración. El cociente respiratorio obtenido para la levadura *P. kluyveri* evidenció mejor resultado con azúcar, la levadura *I. terricola* con glicerol consumo de O2 utilizados fue con un coeficiente de correlación igual a 0.9951, 0.9929 y 1 respectivamente. Finalmente, se estudiaron la evolución de las variables como el pH, consumo de azúcares y biomasa, así como la determinación de parámetros cinéticos, es decir, sus valores de velocidad específica de crecimiento, tiempos de duplicación y división.

Palabras clave: Respiración, Levaduras, fermentación.

INTRODUCCIÓN

Un sistema de adquisición de datos (SAD o DAQ) puede definirse como la interfaz analógica y/o digital capaz de medir diferentes señales eléctricas para conseguir información interesante acerca de un proceso determinado [Padrón, 2012], generalmente se distinguen los siguientes elementos: Sensores.- Son los encargados de medir las variables físicas o químicas y convertirlas en una señal eléctrica medible. Existen sensores de presión, temperatura, pH, de iones específicos (ESI), por mencionar algunos [Ramírez, 2009]. El acondicionamiento de señal.- Que para sensores requiere de un acoplamiento de impedancias, la amplificación y eliminación del ruido, lo que se traduce en el empleo de diversos equipos electrónicos como lo pueden ser amplificadores operacionales, instrumentales, diodos, resistencias, entre otras cosas [Gómez, 2010]. Tarjetas adquisidoras de datos (TAD).- útil para poder tratar la señal eléctrica medible. Computadora personal.- Comúnmente utilizadas debido a su excelente velocidad de procesamiento sobre cantidades elevadas de información que manejan, la cual permitirá al usuario visualizar la información que los sensores han medido [Padrón, 2012].

Por otra parte, el proceso de fosforilación oxidativa, también llamada fosforilación de la cadena respiratoria, puede definirse como el proceso de obtención de energía a partir del sistema transportador de electrones desde moléculas altamente energéticas hasta el O_2 [Dalton, 2004], el cual se rige por la siguiente ecuación:

$$NADH + H + 3ADP + 3Pi + \tfrac{1}{2}O_2 \; NAD + 4H_2O + 3ATP$$

Lo anterior dictamina que la oxidación completa de una molécula de glucosa a CO_2 y H_2O, se puede sintetizar de la forma que a continuación se muestra:

$$C_6(H_2O)_6 + 2Pi + 2ADP + 2NAD \; 2\,Piruvato + 2NADH + 2H + 2ATP + 2H_2O$$

$$2Piruvato + 5O_2 + 30ADP + 30Pi \; 6CO + 36ATP + 42H_2O$$

Análogamente el glicerol para poder metabolizarse requiere convertirse en dihidroxiacetona fostato (DHAP), un intermediario de la glicólisis que a su paso, se transformará en piruvato.

Dicha conversión se logra mediante dos pasos: i) la fosforilación del precursor de la síntesis de triglicéridos, mediante la glicerol quinasa, para la obtención de glicerol 3-fosfato (G3-P) y ii) la subsecuente oxidación a DHAP con ayuda de la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia metodológica para el SAD

Los materiales requeridos fueron los sensores HI1110B, FC300B además del monitor de O 2 molecular YSI 5300A y una tarjeta adquisidora de datos USB 6009 de National Instruments.

La metodología experimental se fundamenta en el acondicionamiento de señal para los sensores (amplificadores operacionales, amplificadores de instrumentación, optoacopladores, capacitores, resistencias fijas y variables, entre otros instrumentos electrónicos), subsecuentemente la programación en LabVIEW y finalmente la validación del equipo mediante soluciones estándar, es decir, soluciones con concentración de H y Na conocidas.

Cepas, condiciones de cultivo y mantenimiento de levaduras

Las cepas de *P. kluyveri, I. terrícola y S. cerevisiae* fueron mantenidas en medio YPD, YPG y YPE (Y= extracto de levadura 1%, P = bactopeptona 1%, D, G y E = glucosa, glicerol y etanol 2%). Dichos microorganismos se mantuvieron en cajas Petri e incubadas a 30°C/24h. El crecimiento se realizó en medio líquido (absorbencia inicial de 0.2) YP rico en glucosa (D), glicerol (G) o etanol (E). Posteriormente se ubicó en un agitador rotatorio SHAKER SI-300R a 180 rpm y 30°C/12 h, al cabo de este tiempo, se practicó una medición de absorbencia del medio utilizando una dilución 1:9 con H2O desionizada sobre un volumen final de 1ml. La medición fue determinada mediante un espectrofotómetro UV-VIS marca JENWAY 6300 empleando una longitud de onda de 600nm. Durante el tiempo de fermentación (36h), se realizaron otras actividades de muestreo cada 2h, a saber, monitoreo de pH, absorbencia, consumo de sustrato y biomasa.

Medición del pH

El monitoreo de pH a temperatura ambiente, fue posible realizarse mediante el electrodo HI 1110B. En la ejecución de dicha acción se tomaron 2ml de la muestra en cada una de las determinaciones.

Crecimiento celular

Fue determinada mediante la medición de absorbencia del medio empleando sobre una celda de plástico un volumen final de 1ml a través de una dilución 1:9 con agua desionizada y realizando la lectura a λ600nm.

Biomasa

La biomasa se cuantificó mediante el procedimiento de peso seco. Las células después de ser lavadas fueron depositadas en contenedores de aluminio, previamente lavados, secados y pesados, para someterlos a peso constante en horno a 60°C/24h, la diferencia entre el peso final e inicial del contenedor refleja la biomasa generada.

Consumo de sustrato

La determinación de ésta variable se realizó a través de la técnica colorimétrica DNS que se fundamenta en la reacción redox que ocurre entre un azúcar reductor y el ácido 3,5- dinitrosalisílico (Miller, 1959). En dicha técnica, se manejó una mezcla cuyo contenido es de 5µl de la muestra, 95µL de H_2O desionizada y 100µl de DNS. Por último, las lecturas se efectuaron en el espectrofotómetro UV-VIS marca JENWAY 6300 a λ540nm.

Respiración celular

Mediante el tratamiento de datos se determinó la hora exacta a la cual las levaduras alcanzan la etapa media logarítmica en la cinética de crecimiento en cada uno de los diferentes sustratos (5 h). Las células fueron lavadas, los ensayos fueron tratados con una concentración de células equivalente a 125 mg/mL, buffer MES-TEA 10mM a pH 6 en un volumen final de 5mL, subsecuentemente se adicionó el sustrato, desacoplante e inhibidores en un lapso de tiempo específico por cada componente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento celular y biomasa

A continuación, en la tabla 1, se muestra los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano de las diferentes cepas de levaduras utilizadas en el presente trabajo en los medios YPD, YPG y YPE. Las levaduras con menor tiempo de duplicación alcanzaron el final de la fase exponencial más rápidamente y por consecuencia consiguen mejor adaptación al medio [González, 2015], por ejemplo, *I. terricola* en medio YPD terminó la fase exponencial a la hora 8 y sus similares a la hora 10 (datos no mostrados), en consecuencia su valor en la variable t_d es menor.

Tabla 1.- Parámetros cinéticos obtenidos para S. cerevisie, P. kluyveri e I. terrícola en glucosa, etanol y glicerol.

Levadura	YPD			YPG			YPE		
	m (h^{-1})	t_d (h)	d (h^{-1})	m (h^{-1})	t_d (h)	d (h^{-1})	m (h^{-1})	t_d (h)	d (h^{-1})
S. cerevisiae	3.48	0.20	5.01	6.97	0.1	10.05	7.72	0.09	11.13
P. kluyveri	3.36	0.201	4.85	7.99	0.09	11.52	7.89	0.09	11.38
I. terrícola	4.86	0.14	7.35	7.30	0.09	10.53	6.39	0.11	9.21

Análogamente, la fase exponencial en los medios YPG y YPE., respectivamente, para S. cerevisiae, P. kluyveri e I. terrícola concluyó a la misma hora, razón por la cual su t_d es muy semejante. Por otro lado, P. kluyveri registró menores valores en tiempo y velocidad específica de crecimiento en medio formulado con glucosa, asimismo, S. cerevisiae en medio rico con glicerol e I. terrícola en medio donde el sustrato fue el alcohol. Pese a lo anterior, fue en medio YPD donde P. kluyveri presentó el más alto valores de biomasa con $3.8X10^{-3}$ S. cerevisiae con $3.5x10^{-3}$ de carbono fue el glicerol alcanzando un valor de $2.7x10^{-3}$ crecimiento de levaduras disminuyo, se obtuvo una pauta semejante y solamente por poco *S. cerevisia*e sobrepaso a las levaduras no convencionales. Sin embargo, existen reportes de que éstas últimas, poseen la capacidad de asimilar el alcohol en una cantidad igual o mayor a 10% v/v [Martínez, 2013].

Oximetrías

Los trazos que en lo subsecuente se exhibirán, son representativos de dos experimentos similares. Cada gráfico es evidencia del consumo de oxígeno ocasionado por *S. cerevisiae, P. kluyveri e I. terricola* posterior a un ayuno de 5 h, en ellos se evaluaron la sensibilidad del SAD y la respuesta de los microorganismos frente a FCCP, AA y KCN utilizando como sustratos glucosa, glicerol y etanol, (datos respectivamente. El oxígeno saturado disuelto equivale a 400 natg/ml en un volumen final de 5ml, lo que se traduce a un total de 2000 natg de oxígeno en la cámara de muestras [Sánchez, 2006], por lo tanto, los resultados de oximetría quedan expresados en estas unidades.

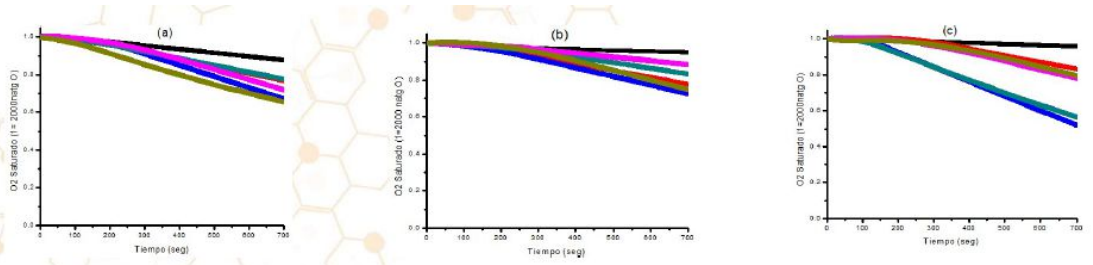


Figura 1.- Consumo de oxígeno por *S. cerevisiae* (a), *P. kluyberi* (b) e *I. terrícola* (c) sin sustrato (—■—), con glucosa (—●—), glucosa + FCCP (—▲—), glucosa + AA (—▼—), glucosa + KCN (—◀—) y un tratamiento combinado de glucosa, desacoplante e inhibidores (—▶—).

La línea marcada con el nombre sin sustrato, tiende a ser paralela al eje "x" donde se ha graficado el tiempo, es decir, es la de menor pendiente debido a la ausencia o poca producción de ATP inducido por la falta de sustrato, refiriéndose así, al estado 4 o de reposo de la respiración [Nelson, 2004]. Por otro lado, a pesar del tiempo de ayuno, puede observarse que existió una disminución progresiva de la

respiración estimulada por el azúcar, el alcohol y aunque muy discretamente, por el glicerol, línea roja (figuras no mostradas) estado activo de la respiración [Nelson, 2004]. La acción que ejercen los desacoplantes como FCCP en la cadena transportadora de electrones, es el impedimento de la fosforilación del ADP para convertirlo en ATP, se caracterizan por promover el aumento en la velocidad de consumo de O_2, línea azúl, y permitir el transporte electrónico [Nelson, 2004]. Así pues, similarmente a CCCP, FCCP en su forma protonada posee facilidad para adentrarse en la membrana mitocondrial interna destruyendo el potencial electroquímico de la respiración y naturalmente, como ya se mencionó, la producción de ATP [Cámara, 2005]. A diferencia de los anteriores, los inhibidores imposibilitan dos cosas: i) la estimulación del consumo de O_2 por efecto del ADP y ii) la fosforilación del ADP en ATP [Nelson, 2004]. Se ha comprobado en *S. cerevisiae* y en la levadura marina *D. hansenii*, que al utilizar una concentración de 0.2 mM de cianuro, se inhibe la respiración en su totalidad [Sánchez, 2006], bajo esa condición, donde se usó de alimento al glicerol, se corrobora que el KCN bloquea marcadamente el consumo de oxígeno en las tres levaduras, es decir, en *P. kluyveri, S. cerevisiae e I. terricola*. Un efecto parecido puede observarse con la glucosa, y en menor proporción con etanol. Una concentración de 2mM de Antimicina A es también capaz de inhibir el consumo de oxígeno [Sánchez, 2006], sin embargo, en los ensayos se probó con una concentración mucho menor, 2µM (Datos no mostrados). Adicionalmente se adjunta la tabla 2 donde se compara la actividad específica, es decir, el consumo de O_2 desarrollado entre los estados 4 y 3 de la respiración, cálculo que resulta de una diferencia en el tratamiento de pendientes en un experimento combinado, esto es, sustrato con desacoplante e inhibidores, y que es útil para conocer el valor del cociente respiratorio, tabla 3, también llamado relación o índice control- aceptor [Cámara, 2005].

Tabla 2.- Actividad específica de *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* y *I. terricola* desarrollada en glucosa, glicerol y etanol.

Microorganismo	Actividad específica (natg O_2 / min * mg de células)		
	Glucosa	Glicerol	Etanol
S. cerevisiae	636.8	532.8	1278.4
P. kluyveri	468.8	280	217.6
I. terrícola	465.6	680	1652.8

El cociente respiratorio es una variable dependiente de la actividad específica, su valor numérico resulta de la relación entre el estado 3 (estado activo) respecto al estado 4 (estado pasivo).

Tabla 3.- Cocientes respiratorios obtenidos para *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* e I. terrícola en glucosa, glicerol y etanol.

Sustrato	Cociente Respiratorio		
	S. cerevisiae	***P. kluyveri***	***I. terrícola***
Glucosa	-0.5794	0.0646	-0.7445
Glicerol	-0.06934	0.4462	0.4538
Etanol	37.375	-37.6364	-1.26535

Cuando se trabaja con mitocondrias aisladas, condiciones no ensayas, son normales valores por encima de 10, análogamente cuando se trata de células envejecidas o lesionadas esa relación desciende a 1

[Nelson, 2004]. La explicación a los resultados negativos del cociente control-aceptor se dice que es debido al proceso de consumo de O_2 no mitocondrial, donde también se implica que la inhibición de la respiración, específicamente en el complejo III, está aumentando la liberación de especies reactivas de oxígeno provocado por el estancamiento de los electrones en el ciclo de las quinonas lo que conlleva a una posible afectación de la fosforilación oxidativa, es decir, una situación de estrés oxidativo [Cámara, 2005].

CONCLUSIONES

Los circuitos de acondicionamiento de señal para los tres sensores (HI1110, FC300B y monitor de O_2 biológico 5300A), funcionan correctamente con sensibilidad tal que permiten su empleo en la investigación de eventos biológicos que tienen su origen común en la cadena transportadora de electrones, objetivo para el cual fue diseñado. El medio YPD fue donde las levaduras se pudieron adaptar más favorablemente. Por otro lado, en cuestiones de oximetría, el desacoplante FCCP a concentraciones de 10µM promueve el consumo de oxígeno, mientras que con 2mM de KCN se inhibe el complejo IV de la respiración en *S. cerevisiae, P. kluyveri e I. terricola*. Antimicina A suministrada en una concentración de 2µM, no ejerce efecto inhibitorio.

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los donativos parciales del proyecto "Convocatoria de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica del TecNM 2017-1" (6130.17-P).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] J. Padrón, “Instrumentación, adquisición de datos para laboratorio multidisciplinar y motorización de bomba manual de mecate”, Universidad Carlos III de Madrid, Escuela Politécnica Superior, Departamento de Ingeniería Térmica y de Fluidos, Leganés. 2012.

[2] F. Ramírez, “Sistema de adquisición de datos de sensores analógicos y digitales”, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Departamento Académico de Ingeniería en Control y Automatización, México D.F.2009.

[3] G. L. Miller, “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar,” Anal. Chem., vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.

[4] C, “Producción de trehalosa a partir de levaduras no- convencionales”, Revista Mexicana de Ingeniería Química, vol. 14, pp. 11-23, D. F., México. 2015.

[5] I. Mertínez-García, L.A. Madrigal-Pérez, “Tolerancia y producción de etanol por Pichiakluyveri 13 e Issatchenkia terrícola 14”, Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo, División de Ing. Bioquímica, Laboratorio de Biotecnología Microbiana. 2013.

[6] N.S. Sánchez, M. Calahorra, J.C. González-Hernández, A. Peña A, “Glycolytic sequence and respiration of Debaryomyces hansenii as compared to Saccharomyces cerevisiae”, pp 361-374, D. F., México. 2016.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β-GLUCOSIDASA EN LEVADURAS NO-CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE FRUTILLAS.

[1]Ramírez-Conejo, J.D., [1]Rendón-Castañeda, I.N., [1,2]Márquez-López, A., [2]Chávez-Parga, M.C., [1]Valencia-Flores, D.C., [1]Álvarez-Navarrete, M., y [1*]González-Hernández, J.C.

1. Laboratorio de Bioquímica del Depto. de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia-Tecnológico Nacional de México. C.P. 58120. Morelia, Mich. México.
2. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Ingeniería Química

*Autor para correspondencia: jcgh1974@yahoo.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN
El ácido elágico y los elagitaninos han logrado gran relevancia debido a la reducción o prevención de enfermedades tales como el cáncer, enfermedades cardiacas, inhibición de bacterias, parásitos y virus, como el VIH y Papiloma. Actualmente se están haciendo estudios para determinar enzimas, las cuales serán utilizadas en la hidrólisis enzimática de elagitaninos provenientes de frutillas, como es Fresa (*Fragaria sp.)* y Zarzamora (*Rubus sp*.) para la obtención de ácido elágico. El presente trabajo evalúa particularmente la presencia y actividad de la enzima β-glucosidasa en levaduras no-convencionales con tres medios inductores (glucosa, sacarosa y celulosa). La actividad β-glucosidasa extracelular se presentó en las levaduras del género *Candida y Pichia* principalmente, siendo los medios con glucosa y sacarosa los de mayor capacidad para inducir la actividad, la cual presentó valores máximos con las cepas *Pichia pastoris* en el medio suministrado con glucosa (8.59X10-8 μmol/min mg de proteína), *Pichia kluyvery* en el medio con sacarosa (5.04X10-8 μmol/min mg de proteína) y *Candida utilis* en celulosa (3.4X10-8 μmol/min mg de proteína).

PALABRAS CLAVE
Ácido elágico, β-glucosidasa, levaduras no-convencionales.

INTRODUCCIÓN

Se ha realizado una gran cantidad de investigaciones para la producción de ácido elágico a partir de la degradación de elagitaninos donde se han utilizado como organismos productores de enzimas diversas cepas de hongos filamentosos del genero Aspergillus, así como, diferentes fuentes vegetales ricas en elagitaninos, sin embargo, el proceso de producción utilizando hongos conlleva el aumento de la cantidad de sustrato utilizado para su crecimiento, del tiempo de fermentación, así como los costos de energía, por lo tanto, es necesario plantear alternativas para mejorar este proceso. Las levaduras no-convencionales pueden seruna alternativa para la producción de ácido elágico, mediante la degradación enzimática de elagitaninos obtenidos de Fresa y Zarzamora. Para lo cual se ha comenzado la determinación de la actividad enzimática para β-glucosidasa en estos microorganismos: *D. hansenii*

PYCGS115, *D. hansenii* ISA1510, *C. utilis, Candida parapsilosis, P. kluyvery, Isstachenkiaterricola, P. pastoris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de fermentación

Se realizaron cinéticas de crecimiento a 30°C, 32 horas y 180 rpm en agitador SI-300R, en medios con MgSO4 (0.5 g/L), K2HPO4 (1 g/L), KH2PO4 (1 g/L), NA2HPO4 (3 g/L), CaCl2 (0.02 g/L), peptona de caseína (10 g/L), extracto de levadura (10 g/L) y fuente de carbono glucosa, celulosa y sacarosa como inductores de la actividad enzimática (20 g/L).

Concentración celular

Se determinó la concentración celular por conteo directo en cámara de Neubauer utilizando 100 µL y azul de metileno al 1% para la tinción de las células.

pH

Se tomó una muestra de 1.5 mL cada 4 horas durante las 32 horas de desarrollo de las cinéticas, por medio de un potenciómetro marca Hanna Instruments® se midió el potencial de hidrogeno.

Azúcares reductores

Mediante la técnica de Miller [1] se analizó el consumo de azúcares reductores en los tres diferentes medios. Se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se centrifugó y se retiró el sobrenadante del cual se tomaron 10 µl los cuales se mezclaron con ácido 3,5-dinitrosalicilico (DNS) y se llevaron a reacción a 100°C en baño maría para posteriormente llevarlos a un baño de hielo. La solución se midió en espectrofotómetro PerkinElmer Lamda® 35 a 540 nm.

Cuantificación de proteína

Se analizó la producción de proteína extracelular por la técnica de Bradford [2], para la cual se tomaron 50 µl del sobrenadante obtenido por centrifugación del medio de fermentación, se hicieron reaccionar con reactivo de Bradford y se cuantificó en el espectrofotómetro PerkinElmer Lamda® 35 a 595 nm.

Actividad enzimática

Se tomó una alícuota de 1 mL cada 4 horas, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, del cual se utilizaron 100 µl y se mezclaron con una solución de p-nitrofenil-β-D-glucopiranósido en buffer de fosfatos/citratos. La mezcla se mantuvo en incubación durante una hora a 40°C en termobaño Felisa®, posteriormente la reacción se detuvo con una solución de carbonato de sodio al 20% (p/v) y se mantuvo en incubación durante 30 minutos. Posterior a la incubación se midió en el espectrofotómetro PerkinElmer Lamda 35 a 400 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinéticas de crecimiento

Se observó que el metabolismo de las levaduras analizadas se aceleró al utilizar glucosa como fuente de carbono, siendo un sustrato apto para su crecimiento, el cual fue corroborado con la breve duración de la fase exponencial, por su parte la fase de adaptación para la levadura *I. terricola* fue menor en comparación con el resto de las levaduras. La fase estacionaria se presentó de manera general alrededor

de la hora 12 con excepción de las cepas *D. hansenii* ISA1510 e *I. terricola*, la cual se mostró en la hora 8, como se observa en la Figura 1a.

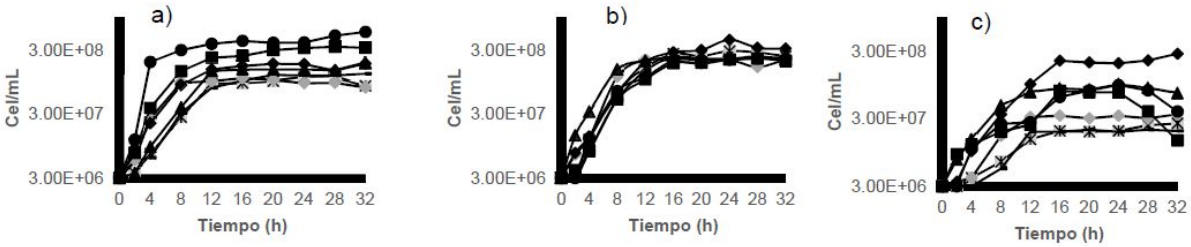


Figura 1. Crecimiento celular de levaduras no-convencionales utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* ( ), *D. hansenii* PYCGS115 ( ), *D. hansenii ISA1510* ( ), *C. utilis* ( ), *P. kluyveri* ( ), *I. terrícola* ( ), *C. parapsilosis* ( ).

Para las cinéticas cuya fuente de carbono suministrada fue la sacarosa, se observa el crecimiento similar al obtenido en las cinéticas realizadas con glucosa, se presenta una fase de adaptación corta pero la fase de crecimiento exponencial es más prolongada respecto a las cinéticas con glucosa. La fase exponencial inicia de manera general alrededor de la hora 2 y se llega a la fase estacionaria en un tiempo cercano a las 12 horas. Ver Figura 1b. El crecimiento de las levaduras en el medio con celulosa como fuente de carbono es menor en comparación con las otras fuentes de carbono estudiadas, como se aprecia en la Figura 1c.

Se observan fases de adaptación y de crecimiento exponencial prolongadas para la mayoría de las cepas, iniciando la fase estacionaria entre las horas 12 y 16. Esto indica una baja capacidad de metabolizar esta fuente de carbono con excepción de *C. utilis*, la cual no muestra fase de adaptación y su crecimiento exponencial se detiene en la hora 12 mostrando un comportamiento similar al obtenido en los medios con sacarosa y glucosa.

pH

El potencial de hidrogeno (pH) es un indicador de la actividad metabólica llevada a cabo por la célula. Los cambios de pH en los medios con glucosa y sacarosa (Figura 2a y 2b, respectivamente) tienen un comportamiento similar en el que el crecimiento celular provoca una disminución del pH, el cual se puede deber a la liberación de protones, de ácidos orgánicos al medio de fermentación, así como, a que la levadura toma los nitrógenos de los aminoácidos orgánicos, cambiando su carácter anfótero a ácido, [3]; y una subsecuente estabilización en el pH de los sistemas de homeostasis de la levadura [4]. La cepa *C. utilis* mostró una acidificación constante de los medios con glucosa y sacarosa durante todo el desarrollo de la cinética. De manera contraria a lo observado en los medios con glucosa y sacarosa, las fermentaciones llevadas a cabo con celulosa como fuente de carbono mostraron una ligera tendencia a la acidificación para consecuentemente observarse una alcalinización significativa de los medios de fermentación (Figura 2c). Dicha tendencia se debe a la formación de un complejo intermedio entre el ión hidrógeno y un átomo de oxígeno de la cadena glucosídica, atrapando los protones libres en el medio, provocando la alcalinización del medio. Esta estructura intermedia es el paso previo a la degradación hidrolítica de la molécula de célula, en moléculas más simples. La alcalinización se observó principalmente con las cepas *C. utilis y P. kluyveri*, donde los valores de pH al finalizar aumentaron 0.9 y 0.8 unidades en comparación con el valor inicial respectivamente.

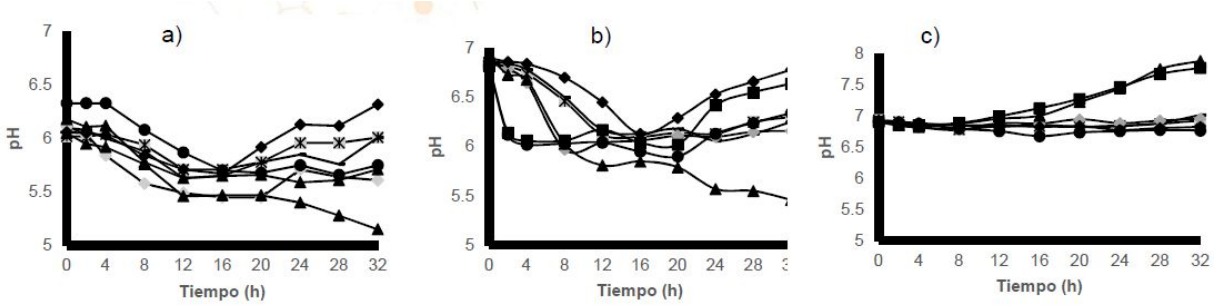


Figura 2. Potencial de hidrogeno monitoreado durante las cinéticas de levaduras no-convencionales utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* ( ), *D. hansenii* PYCGS115 ( ), *D. hansenii ISA1510* ( ), *C. utilis* ( ), *P. kluyveri* ( ), *I. terrícola* ( ), *C. parapsilosis* ( ).

Azúcares reductores

El análisis de los azúcares reductores muestra comportamientos significativamente diferentes en cada uno de los sustratos evaluados. Para los medios suministrados con glucosa se observa su disminución en todas las cepas (Figura 3a). Por el contrario, para los medios de sacarosa y celulosa, no es posible determinar la concentración de azúcares por esta técnica, ya que no son azucares reductores. Sin embargo, para las fermentaciones con sacarosa como fuente de carbono muestran un aumento paulatino en la concentración y su consecuente disminución hasta el final de la fermentación, lo cual se atribuye a la descomposición de la sacarosa en los azúcares reductores fructosa y glucosa, siendo visible en las cepas *D. hansenii* ISA1510, *P. kluyvery y C. utilis*, donde el aumento de azúcares reductores se observa hasta la hora 8 para *D. hansenii* ISA1510 y la hora 12 para *P. kluyvery y C. utilis* como se observa en la Figura 3b.

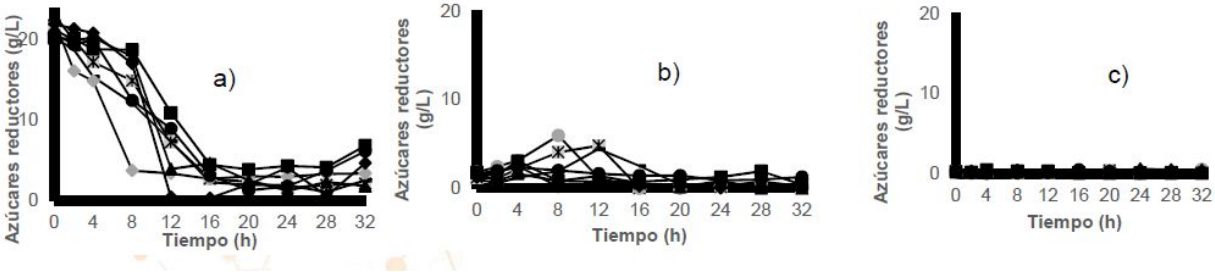


Figura 3. Determinación de azúcares no reductores de levaduras no-convencionales utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* ( ), *D. hansenii* PYCGS115 ( ), *D. hansenii ISA1510* ( ), *C. utilis* ( ), *P. kluyveri* ( ), *I. terrícola* ( ), *C. parapsilosis* ( ).

Como se observa en la Figura 4a, la actividad enzimática en medio de crecimiento con glucosa, *P. pastoris* mostró mayor actividad enzimática respecto al resto de las levaduras, comenzando en la hora 12 con 1.06 E-7 µmol/ min mg de proteína con un máximo de 1.49 E-7 µmol/ min mg de proteína, seguida de *C. parapsilosis*, con un máximo en la hora 24, con 1.16 E-7. En la figura 4 b), se muestran las actividades enzimáticas correspondientes en medio con sacarosa, en donde la mayor actividad enzimática la presento *P. kluyvery*, seguida de *C. utilis y P. pastoris*, las tres levaduras presentaron un comportamiento similar, teniendo un aumento considerable en la hora 20, registrando sus máximos en 24 horas, con 1.36 E-7, 1.02 E-7, y 6.38 E-8, respectivamente. Las levaduras convenciones evaluadas,

metabolizaron la celulosa, sin embargo, *C. utilis*, es la única que presento actividad enzimática a partir de la hora 20 de fermentación. Los resultados obtenidos muestran que las levaduras del género *Candida y Pichia*, son productoras de β-glucosidasa, las cuales han sido reportadas con actividad intracelular y extracelular, [5]. Además se aprecia que la actividad enzimática está estrechamente correlacionada con el inicio de la fase de crecimiento, presentando el máximo durante la fase estacionara. La glucosa y la sacarosa, fueron mejores inductores que la celulosa de la actividad de la enzima β-glucosidasa, la cual, independientemente de su compleja estructura y gran cantidad de enlaces β-1-4, representa un reto para los procesos de hidrólisis, debido a que estará determinada por el área de contacto entre la enzima y la molécula, así como, por la cristalinidad de la misma, debido a que en moléculas amorfas de celulosa, la hidrólisis se lleva con mayor facilidad, que en las moléculas cristalinas, [6].

CONCLUSIONES

La búsqueda de cepas de microorganismos con actividad β-glucosidasa es un tema de gran interés en la actualidad, esto debido a la gran diversidad de aplicaciones tecnológicas que presenta, así como a la utilización de nuevas fuentes de carbono en los procesos biotecnológicos. La actividad β-glucosidasa extracelular se presentó en las levaduras del género *Candida y Pichia* principalmente, siendo los medios con glucosa y sacarosa los de mayor capacidad para inducir la actividad.

AGRAEDCIMIENTOS

Se agradecen los donativos parciales del proyecto de la "Convocatoria Investigación del Tecnológico Nacional de México 2017-2" (No. 6268.17-P).

REFERENCIAS

[1] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," Anal. Chem., vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.

[2] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," Anal. Biochem., vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.

[3] J. C. González-Hernández, M. A. Alcántar-Covarrubias, and C. Cortés-Rojo, "Producción de trehalosa a partir de levaduras no-convencionales," Rev. Mex. Ing. Quim., vol. 14, no. 1, pp. 11–23, 2015.

[4] R. Serrano, M. C. Kiellandbrandt, and G. R. Fink, "Yeast Plasma-Membrane Atpase Is Essential for Growth and Has Homology with (Na++K+), K+- and Ca-2+-Atpases," Nature, vol. 319, no. 6055, pp. 689–693, 1986.

[5] I. Rosi, M. Vinella, and P. Domizio, "Characterization of β-glucosidase activity in yeasts of oenological origin," J. Appl. Bacteriol., vol. 77, no. 5, pp. 519–527, 1994.

[6] M. A. Villena, J. F. Ú. Iranzo, and A. I. B. Pérez, "β-Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology," Enzyme Microb. Technol., vol. 40, no. 3, pp. 420–425, 2007.

EFECTOS ANTAGONISTA Y ANTIMICROBIANO DE HONGOS AISLADOS DEL MICROBIOMA DE NOPALES SILVESTRES (*Opuntia spp*.)

Zamora-Andrade, C.A., Perrusquia-Hereida, R. Ma., González-González, Ma., y * Joaquín-Ramos, A.

Instituto Tecnológico de Roque, Km.8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, C. P. 38110, Tel: 01 461 6 11 59 03, 01 461 6 11 63 62 ext. 142.

*Autor para correspondencia: ahjoaquin@itroque.edu.mx

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

El nopal es una planta ampliamente distribuida en México que suele crecer de manera silvestre en zonas áridas y semidesérticas, existen reportes que relacionan a los microorganismos asociados a las plantas con la resistencia al estrés biótico y abiótico [1,2]. El micro bioma de las plantas está compuesto por microorganismos endófitos que se relacionan de manera inter o intracelular dentro de los tejidos sin causar daño aparente [3] y aquellos microorganismos exógenos que se encuentran principalmente en la rizósfera ayudando a las plantas a obtener nutrientes y asimilarlos eficientemente [4]. Estos microorganismos han llamado la atención de investigadores alrededor del mundo pues algunos de los metabolitos que producen tienen la capacidad de encender la resistencia sistémica adquirida para aminorar los efectos de la infección por fitopatógenos [5] y algunos otros metabolitos aislados de estos microrganismo tienen la capacidad de inhibir bacterias que podrían ser transmitidas por los alimentos [1]. En este trabajo se asilaron hongos endófitos y de la rizósfera de nopales que crecen de manera silvestre en el cerro del Ate en Apaseo el Alto, Guanajuato para analizar su uso potencial en la industria agroalimentaria. Los hongos se aislaron de tejido estéril de tallo, cladodios y frutos y; de la tierra que estaba adherida a la raíz de los nopales. Estos microorganismos se caracterizaron morfológicamente empleando la técnica de micro cultivo. Los hongos se retaron contra los hongos patógenos de plantas: *Fusarium oxyporum, Fusarium vertisillium, Phytopthora capsici, Botrytis cinérea*, *Colletotrichum lindemuthianum* y; contra las bacterias: Gram negativas: *Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurum, Salmonella Agona y Escherichia coli* y; contra la gram positiva *Staphyloccocus aureus.* Se lograron aislar de manera axénica 14 hongos del microbioma de *Opuntia spp.,* 6 de la rizósfera, 3 del tallo, 2 del cladiodo y 3 del fruto, representados los siguientes géneros: *Alternaria spp. Mortierella spp., Torulopsis spp., Mytilinidion spp. Rhizoctonia spp., Cokeromyces spp.* y una actinomiceto del género *Niocardia spp.* Entre ellos destacan el actinomiceto *Niocardia spp.* que mostró actividad antagónica contra *P. capsici* y los hongos fitopatógenos excepto *C. lindemuthianum* y contra las *bacterias E. coli y S. aureus* un comportamiento similar se observó en los géneros *Alternaria spp.*

Palabras clave: Micro bioma; endófitos; antagonismo; antimicrobiano.

REFERENCIAS

[1] P. B. Ratnaweera, E. D. de Silva, D. E. Williams, and R. J. Andersen, "Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant Opuntia dillenii and the isolation of equisetin, from endophytic Fusarium sp.," BMC Complement. Altern. Med., vol. 15, p. 220, 2015.

[2] L. López, "El nopal , más que un símbolo patrio," Gaceta Universitaria, Guadalajara, Jalisco, p. 1, Sep-2000.

[3] H. Zhang, "Advancement in endophytic microbes from medicinal plants," Int. J. Pharm. Sci. Res., vol. 5, no. 5, pp. 1589–1600, 2014.

[4] L. Tedersoo and B. Lindahl, "Fungal identification biases in microbiome projects," Environ. Microbiol. Rep., vol. 8, no. 5, pp. 774–779, 2016.

CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE BACTERIAS PRESENTES EN ELPROCESO DE FERMENTACIÓN DEL MEZCAL.

Solórzano-Villanueva, V., Covián-Nares, F., Garambullo-Peña, T.I., y *González-Hernández, J.C.

Laboratorio de Bioquímica de Depto. de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia-Tecnológico Nacional de México. C.P. 58120. Morelia, Mich. México.

*Autor para correspondencia: jcgh1974@yahoo.com

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

El Mezcal es una bebida alcohólica auténticamente mexicana, obtenida por destilación de mostos, preparado con azúcares extraídos de las cabezas o piñas maduras de diversas variedades de Agave, previamente hidrolizadas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras y bacterias. Tomando en cuenta los efectos positivos y/o negativos de la presencia de diferentes microorganismos en el sistema de fermentación alcohólica espontánea, es importante conocer su identidad y prevalencia para poder inferir su participación en las características bioquímicas y organolépticas finales del producto. En el presente trabajo se obtuvieron diferentes cepas de una mezcalera ubicada en el municipio de Etúcuaro, Michoacán., con la finalidad de caracterizarlas utilizando algunas técnicas de Biología Molecular. Se extrajo DNA y se amplificó utilizando primers especifícos., el producto obtenido fue purificado con kits comerciales y enviado para su secuenciación de tipo Sanger en Langebio del Cinvestav de Irapuato. La última etapa es la comparación de las secuencias del ADNr 16S obtenidas dela secuenciación en alguna base de datos públicas, cuyo acceso es libre a través de internet. Después de haber analizado y comparado las secuencias Se encontraron ocho diferentes especies que corresponden a los géneros: Bacillus, Staphylococcus y Kocuria: Bacillus pumillus, Bacillus cereus (2 cepas), Staphylococcus, Staphylococcus epidermis, Bacillus pumilus, Kocuria marina, Bacillus megatherium y Bacillus sp. En estos momentos desconocemos el papel que juegan las bacterias en fortificar a la bebida, pero si es factible sugerir que los microorganismos aislados (Bacillus cereus y B. subtilis y un Bacillus sp.) proporcionan una parte de la microbiota fermentadora a la que se le atribuyen las propiedades organolépticas de la bebida. Las bacterias caracterizadas en el mezcal de Etúcuaro Michoacán, difieren en su mayoría con las encontradas en mezcales de otras regiones, tanto dentro del estado como de otros. Se concluye que la microbiota participante en el proceso de fermentación del mezcal, depende básicamente de la materia prima utilizada para su elaboración, así como las condiciones climáticas e inocuas presentes en el momento de su preparación.

Palabras clave: Mezcal, bacterias, fermentación.

INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida destilada auténticamente mexicana, elaborada de forma tradicional, sin la necesidad de añadir microorganismos, basta con los presentes en el sustrato, lo que se conoce como fermentación espontánea. La bebida es el resultado de la interacción de varias especies, tanto de levaduras como bacterias. Estas fermentaciones consiguen características organolépticas típicas de la

zona que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. La composición de la microbiota encontrada durante el proceso de fermentación depende principalmente de la región de origen, de la materia prima, el procedimiento de producción, la temperatura y el pH, (Torijaet al., 2001; Granchiet al., 1999). El crecimiento bacteriano se inicia con la captación de nutrientes a partir del ambiente y los pasos intermedios entre la captación de nutrientes y la división celular constituyen el metabolismo bacteriano. El metabolismo bacteriano está compuesto de dos etapas. Durante el anabolismo las sustancias simples se convierten en sustancias complejas y durante el catabolismo las sustancias complejas se convierten en sustancias simples (Rodríguez, 2012). Los microorganismos que obtienen la energía por procesos fermentativos son anaerobios estrictos o facultativos.

Michoacán cuenta con un padrón cercano a los 300 productores de Mezcal, distribuidos en 66 comunidades, con una superficie estimada de producción de agave mezcalero de temporal de 3 mil 218 hectáreas y una superficie establecida de agave mezcalero comercial de 587 hectáreas, lo que permite una recolección anual de piñas de agave mezcalero de 556 mil 500 kilogramos, que son procesadas en 45 vinatas establecidas para realizar una producción de 230 mil litros de mezcal anuales, esto a su vez genera aproximadamente 3 mil 250 empleos directos anuales (INEGI, 2014). Debido a la importancia de la producción de mezcal en el estado, el presente trabajo busca la caracterización filogenética de las distintas bacterias presentes en la fermentación de mezcal, en la región de Etúcuaro Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Los microorganismos caracterizados fueron obtenidos de una mezcalera ubicada en la región de Etúcuaro, Michoacán; durante el quinto día del proceso de fermentación del mosto.

Crecimiento bacteriano e inoculación

El cultivo de microorganismos consistió en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que se multiplicaran de forma controlada. Las 9 cepas de bacterias fueron sembradas en medio de cultivo Mueller Hinton. Una vez sembrada, las muestras fueron colocadas en una estufa a 37°C, 24 hrs. Para la inoculación y crecimiento en medio líquido se utilizó medio Mueller Hinton líquido. Se colocó los tubos inoculados en agitación orbital (LabCompanion IS-300R), a una temperatura de 37°C, 250 rpm durante 24 hrs.

Tinción de Gram

Se realizó la técnica de Gram con la finalidad de caracterizar macroscópicamente los microrganismos de interés, utilizando kit comercial marca Hycell.

Pruebas bioquímicas

Se realizaron las siguientes pruebas Bioquímicas: Eosin Methylene Blue "EMB", SIM, Mac Conkey, T.S.I. Agar (Triple Sugar Iron Agar), Kliger Hierro Agar, MR-VP, Prueba de Rojo de Metilo, Fermentación de carbohidratos, Simmons Citrato Agar, Medio Ureasa, Prueba de licuefacción de gelatina, Prueba de Catalasa.

Extracción de ADN, electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó la técnica de fenol-cloroformo. Una vez aislado el ADN de bacterias, se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1% disuelta en amortiguador TAE 1X, se agregaron 2 µL de bromuro de etidio. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal y se sumergieron en amortiguador TAE 1X. El corrimiento electroforético procedió aplicando 100 voltios durante 15 min.

Cuantificación de ADN bacteriano y reacción en cadena de la polimerasa

El cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm (A260/A280) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos (Alejos, et al. 2012). La reacción de PCR fue realizada con los primers E786F (GATTAGATACCCTGGTAG) y E1541R (AAGGAGGTGATCCANCCRCA). Las condiciones de temperatura de alineamiento fueron de 52°C, 40 ciclos.

Purificación de PCR, Secuenciación

El producto obtenido de la reacción de PCR debe ser purificada para eliminar subproductos, cebadores y dNTP´s contaminantes esto se realizó con el kit de Zymoclean™ Gel DNA Recovery. Una vez obtenido el producto de PCR la secuenciación fue realizada en LanGebio en el Cinvestav de Irapuato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos sembrados en el medio Mueller Hinton, crecieron satisfactoriamente, en la tabla se puede observar el crecimiento de cada cepa bacteriana. Se realizó una evaluación macroscópica para conocer las características de las colonias en las diferentes bacterias (Tabla 1). Se realizó la tinción de Gram bajo la metodología mencionada, los resultados fueron observados bajo el microscopio para conocer el resultado final, cada una de las bacterias observadas bajo un lente de 10X y 40 X se tiñeron de color morado, por lo cual se concluyó que todas son bacterias Gram positivas (fotos no mostradas).

Tabla 1. Características principales de colonia tomada de un cultivo en Mueller Hinton.

	Día 1							
	Tamaño colonia (mm)	Tamaño (mm)	Forma	Margen	Color	Elevación	Superficie	Consistencia
1	0.44	0.72	Circular	Entero	Blanca	Plan	Lisa	Cremosa
2	0.40	0.7	Circular	Entero	blanco	Plano	Lisa	Cremosa
4	0.45	1	Circular	Entero	Blanco	Plano	lisa	Cremosa
5	0.7	1.15	Irregular	ondulado	blanco	Plano	lisa	Cremosa
6	0.4	0.77	Irregular	ondulado	blanca	Plano	lisa	Cremosa
7	0.4	0.6	Circular	Entero	amarilla	Plano	Liso	Cremosa
8	0.43	1.1	Irregular	ondulado	Blanco	Plano	Liso	Cremosa
9			Irregular	ondulado	Blanco	Plano	Liso	Cremosa

Tabla 2. Resultados de las pruebas Bioquímicas.

				TSI		Kliger	
Bacteria	Lactosa	Glucosa	EMB	Lactosa	Glucosa	Lactosa	Glucosa
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	-	-	+	-	+
6	-	+	-	+	+	+	+
7	V	+	+	-	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	-	+	-	-	+	-	+

Tabla 3. Resultados de las pruebas Bioquímicas.

					MRVP		SIM		
Bacteria	Manitol	Gelatina	Fructosa	Urea	Rojo metilo	acetoina	Movilidad	SH_2	Indol
1	+	-	+	-	+	-	+	-	-
2	+	-	+	-	+	-	+	-	-
3	+	-	+	-	+	-	+	-	-
4	+	-	+	-	+	-	-	-	-
5	-	-	+	-	+	-	-	-	-
6	-	-	+	-	+	-	-	-	-
7	-	-	+	-	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	-	-	-
9	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Una vez establecidas las condiciones finales de tiempo, temperatura y reactivos, se llevó acabo la reacción de PCR, para observar que el producto fue amplificado correctamente se realizó una electroforesis en gel de agarosa. La imagen obtenida del producto se muestra en la Figura 1., lo que nos indicó que los parámetros establecidos fueron los adecuados para el propósito planteado. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pb y el producto de PCR se observó entre la banda 6 y 7, lo que indica un tamaño de 600 a 700 pares de bases.

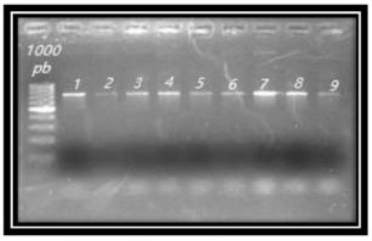


Figura 1.- Resultado de la amplificación por PCR de ADN bacteriano. La banda del lado izquierdo es el marcador de 1000 pb. Las bandas posteriores son los productos de PCR de la 1-9 de izquierda a derecha.

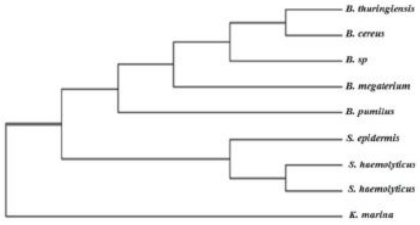


Figura 2.- Árbol filogenético elaborado con el programa Bioedit.

La purificación del PCR se realizó utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. No se presentaron problemas para la purificación de los mismos. Una vez obtenido el producto de PCR purificado se necesita conocer en qué orden se disponen los cuatro nucleótidos (Adenina, Guanina, Citosina, Timina) que componen la molécula. La secuenciación se realizó en LanGebio en el Cinvestav de Irapuato, donde utilizan el método de Sanger. Una vez secuenciado el producto de PCR. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos después de haber utilizado la base de datos NCBI, de libre acceso, ubicada en internet, así como la base de datos llamada Ribosomal Data base. Se presentan los resultados obtenidos de las 9 secuencias comparadas en los bancos de datos, las 9 secuencias pertenecen al dominio bacteria como se esperaba. El árbol filogenético se realizó utilizando el método de Máxima Parsimonia (MP), elegido debido a que selecciona el árbol que tiene el mínimo número de cambios evolutivos, cuyas ramas tengan en promedio la mínima longitud; se basa en el principio conocido como Navaja de Occam: en igualdad de condiciones la solución más sencilla es probablemente la correcta, justificándose por el hecho de que los cambios evolutivos que suceden dentro de lapsos de tiempo cortos son relativamente raros. Es clasificado dentro de los métodos de distancia; primero convierten los alineamientos de secuencias en una matriz de distancias genéticas en base al modelo evolutivo seleccionado, la cual es usada por el método de reconstrucción para calcular el árbol (LS y ME; UPGMA y NJ).

CONCLUSIONES

En estos momentos desconocemos la participación de las bacterias en fortificar a la bebida, pero si es factible sugerir que a los microorganismos aislados se le atribuyen algunas de las propiedades organolépticas y probióticas de la bebida.

En cuanto a las técnicas de biología molecular empleadas se concluye que son adecuadas para la caracterización de las bacterias, ya que mediante la extracción, purificación y amplificación del gen 16s se logró realizar el árbol filogenético de distinguiendo entre género y especie de la mayoría de las cepas.

Las bacterias caracterizadas en el mezcal de Etúcuaro Michoacán, difieren en su mayoría con las encontradas en mezcales de otras regiones, tanto dentro del estado como de otros. Se concluye que la microbiota participante en el proceso de fermentación del mezcal, depende básicamente de la materia prima utilizada para su elaboración, así como las condiciones climáticas e inocuas presentes en el momento de su preparación.

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los donativos parciales del proyecto "Convocatoria de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica del TecNM 2017-1" (6129.17-P).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Rodríguez Martínez, R. (2012). Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. REVISTA SALUD UIS, 43(3).

[2] Granchi L, Ganucci D, Messini A. & Vincenzini M. (2002). Enological properties of Hanseniaspora osmophila and Kloeckera corticis from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. FEMS Yeast Res. 2: 403-407.

[3] Vegas Pérez, C.A. (2010). "Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional". ISBN:/DL: T.1216-2011.

COMPARACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* Y *Kluyveromyces marxianus* EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL, ÉSTERES Y ALCOHOLES SUPERIORES.

Flores-Cosio, G., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., y *Amaya-Delgado, L.

Industrial Biotechnology, CIATEJ, Av. Normalistas 800, Guadalajara 44270, México.

*Autor para correspondencia: lamaya@ciatej.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

Durante la fermentación alcohólica las levaduras no sólo convierten los azúcares en etanol y CO_2, sino que también producen una serie de metabolitos volátiles de interés industrial. Los ésteres representan el mayor grupo de componentes aromáticos producidos durante la fermentación alcohólica; estos son interesantes a nivel industrial, ya que pueden ser utilizados como aromas frutales y florales en la industria de alimentos; estos se forman por la reacción de condensación entre un alcohol y un grupo acilo que integra la coenzima A. Por otro lado, los alcoholes superiores contituyen otro grupo importante de metabolitos derivados de la fermentación alcohólica, que pueden ser utilizados como biocombustibles o como precursores de ellos. Siendo el principal alcohol superior producido en la fermentación alcohólica el isobutanol, que puede ser utilizado como materia prima para la producción de bioturbosina. Por lo que, el objetivo del presente estudio fue evaluar la producción de etanol, ésteres y alcoholes superiores por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* en un medio mineral utilizando glucosa, xilosa o una mezcla equimolar de glucosa y xilosa. Las mayores producciones de etanol, ésteres y alcoholes superiores por *S. cerevisiae* fueron logradas cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, 5.12 g/L, 10.78 mg/L y 14.25 mg/L, respectivamente. Por otro lado, *K. marxianus* produjo las mayores cantidades de ésteres 12.57 mg/L, alcoholes superiores 34.38 mg/L y etanol 4.75 g/L cuando se utilizó una mezcla equimolar de glucosa y xilosa. Por lo que *K. marxianus* OFF1 podría ser una buena candidata para la porducción de etanol y derivados, provenientes de hidrólizados de residuos lignocelulósicos (los cuales están compuestos de una mezcla de hexosas y pentosas).

Palabras clave: *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, etanol, subproductos.

INTRODUCCIÓN

El bioetanol es una fuente de energía renovable, y una de las alternativas al petróleo. Actualmente, la mayor parte del bioetanol se produce a partir de los azúcares de fermentación en materias primas como la caña de azúcar, el sorgo, el maíz, el trigo y constituye lo que se conoce como biocombustible de primera generación [1]. Debido a que los biocombustibles de primera generación provienen de materias primas directamente relacionadas con la alimentación humana o animal y se consideran no éticos, han llevado a la investigación de biocombustibles de segunda generación que provienen de materias primas que no son fuentes alimenticias como el material lignocelulósico. Todos los residuos de biomasa producidos en actividades agrícolas e industriales, e incluso residuos urbanos, tienen altas concentraciones de materiales lignocelulósicos explotables. Independientemente de la biomasa utilizada para producir bioetanol como combustible, el principal objetivo es la sustitución de derivados de

petróleo, lo que permite reducir la dependencia de estos recursos fósiles y mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Los principales pasos que intervienen en la producción de etanol a partir de material lignocelulósico son el pretratamiento, la hidrólisis y la fermentación. Durante el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, se forman azúcares fermentables y muchos compuestos que inhiben la siguiente etapa de fermentación [2]. Levaduras que pueden utilizar eficientemente azúcares heterogéneos (hexosas, pentosas) y soportar las condiciones de estrés en el proceso de bioetanol son claves para la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol y derivados de interés industrial, como los ésteres y alcoholes superiores en un concepto de biorrefinería. Esto ha llevado a la búsqueda y desarrollo de nuevas cepas de levaduras que pueden tolerar inhibidores y pueden asimilar hexosas y pentosas. La levadura *K. marxianus* tiene potenciales ventajas para su aplicación en la producción de etanol, ya que puede asimilar diversos azúcares incluyendo xilosa, arabinosa, sacarosa, rafinosa e inulina además de varias hexosas [3]. Adicionalmente la levadura *K. marxianus* puede producir compuestos de alto valor como ésteres, alcoholes superiores y carbonilos durante la fermentación alcohólica [4]. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el crecimiento y la producción de etanol, ésters y alcoholes superiores, utilizando un medio químicamente definido bajo condiciones controladas. Una cepa con altas producciones de alcoholes puede ser prometedora para fermentar hidrolizados lignocelulósicos para obtener bioetanol y otros subproductos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, condiciones de cultivo y medios

En este estudio se emplearon la cepa comercial *S. cerevisiae* (ERD) y la cepa nativa *K. marxianus* (OFF1). Se preparó un preinóculo en medio YPD y se incubó a 30ºC, pH 4,5 a 250 rpm durante 12 horas. Después de este tiempo, las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en solución fisiológica estéril para lavar y obtener una suspensión de la célula que se usó como inóculo. Los experimentos se llevaron a cabo en un medio químicamente definido (frascos Erlenmeyer de 250 ml) y fueron inoculados con $1e^6$ cel mL^{-1} (preinóculo). Los matraces se incubaron en un agitador rotatorio a 30ºC, pH 4,5. Para condiciones aerobias, se usaron 250 rpm y 100 rpm para condiciones anaerobias. Se probaron tres fuentes de carbono diferentes, solo glucosa (20 g L^{-1}), solo xilosa (20 g L^{-1}) y una mezcla equimolar de glucosa:xilosa (20 g L^{-1}).

Métodos analíticos

La cuantificación de azúcares se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con un detector de índice de refracción y una columna Aminex HPX-87H de Biorad (300 mm x 7.8 mm, 9 µm). Las condiciones de operación fueron las siguientes: una temperatura de 50 ºC, un flujo de 0.5 mL/min, como fase móvil H_2SO_4 5Mm. La cuantificación de etanol y compuestos volátiles se realizó mediante cromatografía de gases (GS) en un cromatógrafo Agilent (modelo 7890B) un detector de ionización de flama, acoplado a un automuestrador Head-space (modelo 7697A). Para la separación de los compuestos se utilizó una columna HP Innowax (60 m X 0.32 mm X 0.25 µm) con una presión de 23.787 psi y un flujo de 1.3 mL/min para una velocidad de 24.502 cm/seg. La rampa de calentamiento del horno inició a 45 °C por 8 min y enseguida se llevó a 80 °C por 0 minutos a una tasa de 2 °C/min, posteriormente se incrementó la temperatura 5 °C/min hasta llegar a 160 °C por 0 minutos para finalmente llegar a 220 °C a una tasa de 25 °C/min por 4 min. La temperatura del detector fue de 250 °C, los flujos de los gases fueron: Helio 40 mL/min, aire 400 mL/min y Nitrógeno 30 mL/min. El Head-space se programó bajo las siguientes condiciones: Temperatura del vial de 90 °C por 5 min, temperatura del

loop de 110 °C, temperatura de la línea de transferencia 115 °C, tiempo de equilibrio 5 min, tiempo de inyección 0.5 min, tiempo del ciclo 60 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento y consumo de sustratos

La cepa *K. marxianus* (OFF1) fue la que presentó un mayor crecimiento en todos los medios probados. En un medio con glucosa a condiciones aerobias la cepa *S. cerevisiae* (ERD) logró consumir toda la glucosa despues de las 20 horas, mientras que OFF1 solo consumió un 30%. En esta condición se observó la mayor tasa de crecimiento específico (μ) y de consumo de sustrato (μs) para ambas cepas (**Tabla 1**). En condiciones anaerobias ERD y OFF1 consumieron la glucosa a las 8 horas (**Figura 1**). En un medio con xilosa como única fuente de carbono el consumo para ambas cepas fue bastante lento. En condiciones anaerobias ERD solo logró consumir aproximadamente un 15% de los azúcares presentes a las 76 horas; mientras que OFF1 fue la cepa que más azúcares consumió (aproximadamente un 40%). El crecimiento en el medio con xilosa como única fuente de carbono a condiciones anaerobias fue el más lento, en comparación con los otros medios probados (esto también se reflejó en una menor tasa de consumo de sustrato). En la mezcla glucosa: xilosa (50:50) a condiciones aerobias la tasa de crecimiento específico disminuyó un 50% su en comparación con el medio con glucosa como única fuente de carbono. ERD fue la única que consumió toda la glucosa en condiciones aerobias después de las 24 horas. Bajo las mismas condiciones OFF1 sólo consumió 49% de glucosa. Bajo esas condiciones ninguna cepa consumió xilosa. Se sabe que hay una represión en el consumo de azúcares cuando están presentes más de 1 tipo de azúcares, que pueden estar relacionados con el transporte de azúcares. El transporte de azúcar en la levadura (que implica el metabolismo de los carbohidratos) puede proceder a través de una serie de mecanismos diferentes. Gasnier [5] concluyó que la glucosa puede entrar en las células de *K. marxianus* a través de dos transportadores distintos: un transportador de glucosa de alta afinidad que es un simportador de azúcar de protones y un transportador de baja afinidad con actividad no asociada al movimiento del protón. Fonseca et al. [6] encontraron diferentes comportamientos de crecimiento y consumo de carbohidratos en las mezclas binarias de azúcar; En un medio con fructosa-lactosa observaron una represión total en el consumo de lactosa. El consumo de glucosa y xilosa no ocurre simultáneamente. La represión catabólica o la inactivación del sistema de alta afinidad parece ser un fenómeno general en las levaduras cuando están presentes dos sistemas para el transporte de un azúcar dado. A condiciones anaerobias ambas cepas consumieron toda la glucosa. OFF1 fue la cepa que más azúcares totales consumió al final de la fermentación, con un 80% de total. Después de 76 horas de fermentación, OFF1 logró consumir xilosa en la mezcla de azúcares.

Tabla 1. Tasa de crecimiento específico (μ) y tasa específica de consumo de sustrato (μs)

	μ (h^{-1})		**μs ($g\ l^{-1}h^{-1}$)**	
Condicion/cepa	**ERD**	**OFF1**	**ERD**	**OFF1**
Glucosa,250 rpm	0.43	0.42	0.49	0.41
Glucosa,100 rpm	0.35	0.29	0.11	0.01
Xilosa, 250 rpm	0.09	0.05	0.004	0.014
Xilosa, 100 rpm	0.01	0.04	0.001	0.007
Glucosa:Xilosa (50:50), 250 rpm	0.20	0.22	0.03	0.01
Glucosa:Xilosa (50:50), 100 rpm	0.12	0.17	0.02	0.04

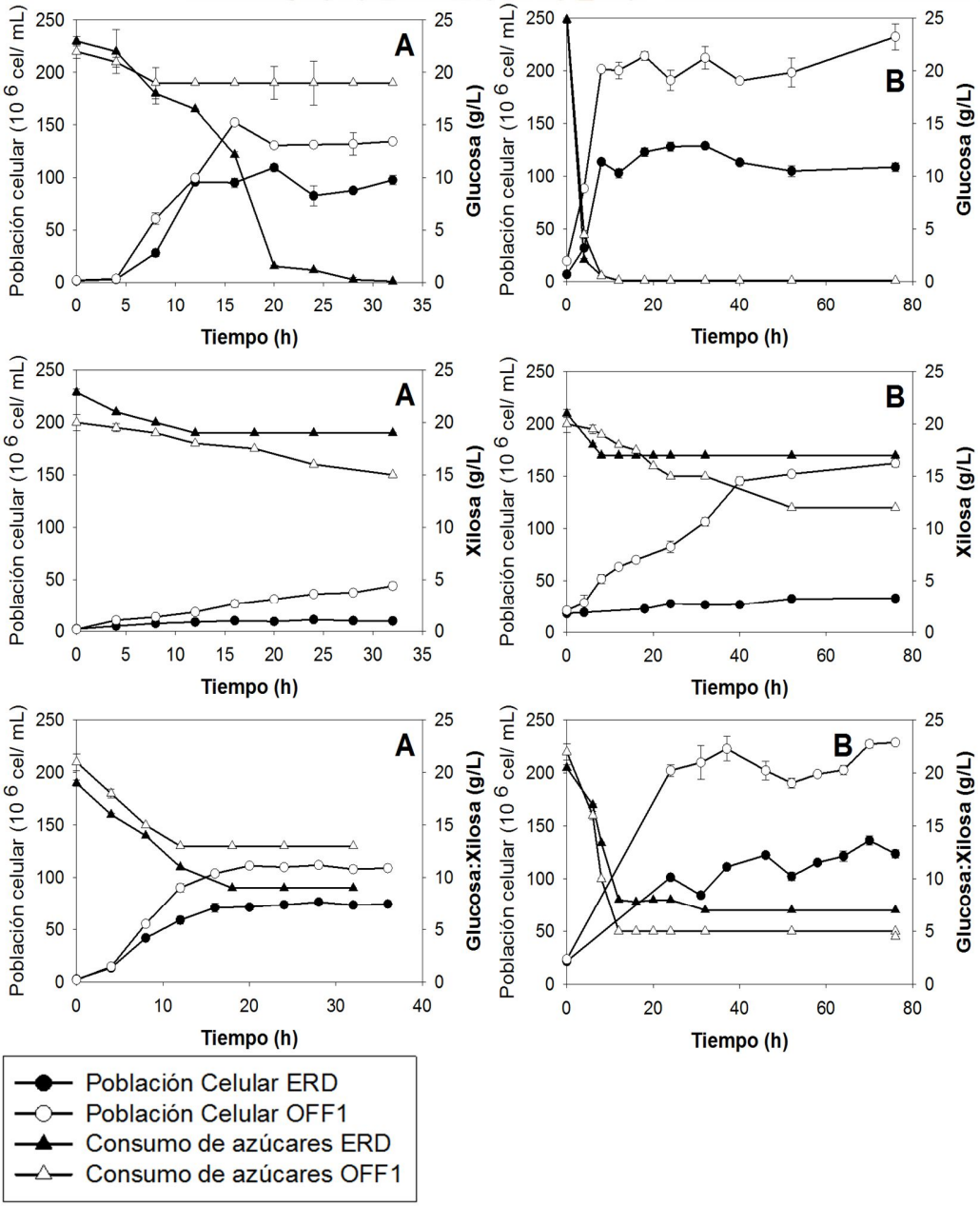


Figura 1. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares para *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae.* Medio químicamente definido. A: condiciones aerobias (250 rpm, 30 ºC). B: condiciones anaerobias (100 rpm, 30ºC).

Producción de etanol y compuestos volátiles (ésteres y alcoholes superiores)

Durante una fermentación alcohólica se produce principalmente etanol y una serie de subproductos que incluyen compuestos de acetales, ésteres, alcoholes superiores y ácidos; que pueden ser utilizados como insumos para la diversas industrias, incluyendo la de los alimentos y la de biocombustibles. Los compuestos volátiles identificados en los diferentes tipos de medio evalaudos fueron alcoholes, ésteres

y aldehídos (**Tabla 2**). En las diferentes fuentes de carbono estudiadas se encontró que en ambas cepas los compuestos volátiles más numerosos detectados fueron los alcoholes, siendo el etanol, isobutanol y el alcohol amílico los más abundantes, mientras que del grupo de ésteres el hexanoato de etilo fue el principal.

En un medio con glucosa como única fuente de carbono, la producción de acetaldehído fue de 20 a 25 mg L^{-1} para ERD y OFF1 respectivamente. Para el grupo de compuestos de ésteres no hubo producción de acetato de isoamilo en ambas cepas. El hexanoato de etilo y el octanoato de etilo producidos fueron similares para ERD y OFF1; sin embargo, se observaron diferencias en el acetato de etilo para OFF1. La cepa OFF1 produjo 70% más acetato de etilo que ERD, por el contrario ERD produjo el doble de lactato de etilo. Muchas levaduras son capaces de convertir el azúcar en acetato de etilo [7]. Se ha reportado que *S. cerevisiae* puede producir solamente trazas de acetato de etilo [8], generando pequeñas cantidades y bajos rendimientos de este éster. En trabajos previos realizados por F. Comitini et al. [9] en *S. cerevisiae* se obtuvo una concentración mayor de acetato de etilo, octanoato de etilo y acetato de isoamilo que la nuestra; sin embargo, nuestra producción de hexanoato de etilo fue mayor. Otras levaduras como *K. marxianus* [10] han probado ser potentes productoras de acetato de etilo. En el caso de alcoholes, la producción de etanol fue superior para ERD. La producción de 1-propanol y 2-feniletanol fue similar en ambas cepas. La cepa OFF1 produjo el doble de isobutanol y alcoholes de amilo.

En un medio con xilosa como única fuente de carbono, se encontró que la producción de acetaldehído es la más baja de los tres medios probados. OFF1 produjo la mayor concentración de acetaldehído (1. 98 mgL^{-1}). La cepa OFF1 fue la única que produjo acetato de isoamilo (1.0 mgL^{-1}) y adicionalmente produjo el doble de acetato de etilo (1.71 mgL^{-1}). No se observó producción de lactato de etilo, excepto para ERD (0.60 mgL^{-1}). La producción de hexanoato de etilo y octanoato de etilo fue similar para ambas cepas. La producción de etanol en xilosa fue de 0,6 a 3% en comparación con un medio con solo glucosa como fuente de carbono. En esta condicion se observó una producción de metanol para ambas cepas. La producción de alcoholes de amilo en OFF1 disminuyó a la mitad en comparación del medio con solo glucosa.

La mayor producción para todos los ésteres (excepto para el hexanoato de etilo) se encontró en la mezcla de glucosa: xilosa. Sólo en este medio se observó una producción de acetato de isoamilo. La producción de lactato de etilo para ambas cepas fue mayor que en un medio con glucosa. La mezcla de carbohidratos también favoreció la producción de la mayoría de los alcoholes superiores. La mayor producción de 1-propanol y 2-feniletanol se obtuvo en este medio. Los valores de 1-propanol fueron tres veces mayores en OFF1 que para ERD. La mayor producción de etanol después de 76 horas fue para ERD con 4.91 gL^{-1} con un rendimiento del 0.35 g ethanol producido g sustrato utilizado^{-1} (**Tabla 3**).

Tabla 2. Compuestos volátiles producidos por *S. cerevisiae* y *K. marxianus* en medio químicamente definido. 100 rpm, 30ºC.

	mgL^{-1}					
Medio	**Glucosa**		**Xilosa**		**Glucosa:xilosa (50:50)**	
Compuesto/cepa	**ERD**	**OFF1**	**ERD**	**OFF1**	**ERD**	**OFF1**
	T76	**T76**	**T76**	**T76**	**T76**	**T76**
Aldehídos						
Acetaldehído	20.47	25.30	1.10	1.98	23.98	20.73

Ésteres						
Acetato de etilo	1.32	4.29	0.80	1.71	1.78	5.80
Acetato de isoamilo	0.0	0.0	0.0	1.01	1.04	1.12
Lactato de etilo	1.22	0.61	0.60	0.0	1.49	1.27
Hexanoato de etilo	7.34	8.19	6.32	3.59	3.82	3.25
Octanoato de etilo	0.90	1.01	1.03	1.00	2.48	1.13
Alcoholes						
Ethanol	5120	4340	90	140	4910	4750
Metanol	0.0	0.0	4.04	4.01	1.74	1.07
1-Propanol	5.57	6.63	0.50	0.61	5.91	13.04
Isobutanol	5.03	16.87	1.67	3.73	6.07	17.83
Butanol	3.32	1.43	0.42	0.66	1.24	1.11
Alcohol amílico	0.33	0.34	0.41	0.03	8.99	2.40

Tabla 3. Rendimiento de etanol en medio químicamente definido con diferentes fuentes de carbono (100 rpm, 30 ºC).

	mgL^{-1}					
Medio	**Glucosa**		**Xilosa**		**Glucosa:xilosa (50:50)**	
Cepa	**ERD**	**OFF1**	**ERD**	**OFF1**	**ERD**	**OFF1**
Y p/s	0.21	0.19	0.01	0.01	0.35	0.32

Y p/s (g ethanol producido g sustrato utilizado).

CONCLUSIONES

La cepa del género *K. marxianus* OFF1 puede ser una cepa prometedora en la industria de los biocombustibles en un concepto de biorrefinería; debido a que además de ser buena productora de etanol, produce ésteres y alcoholes superiores. Los ésteres y alcoholes superiores, se consideran productos de alto valor agregado, como el 1-propanol, isobutanol y el acetato de etilo. Los ésteres volátiles son compuestos industriales importantes, y el acetato de etilo se destaca como uno de los más importantes. Por otro lado, el isobutanol tiene un gran interés en la industria de la avición, ya que se utiliza para la producción de bioturbosina a través del proceso ATJ (Alcohol to Jet).

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Sustentabilidad Energética CONACYT-SENER por el apoyo al Proyecto Clúster de Bioturbosina 248090 y a CONACYT por la beca otorgada a Guillermo Flores Cosio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] M. J. Taherzadeh and K. Karimi, *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review*, vol. 2, no. 4. 2007.

[2] R. M. Almeida, T. Modig, and A. Petersson, "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 82, pp. 340–349, 2007.

[3] N. Lertwattanasakul *et al.*, "Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus DMKU 3-1042.," *AMB Express*, vol. 1, no. 2012, p. 20, 2011.

[4] L. Amaya-Delgado, E. J. Herrera-López, J. Arrizon, M. Arellano-Plaza, and A. Gschaedler, "Performance evaluation of Pichia kluyveri, Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae in industrial tequila fermentation," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, no. 5, pp. 875–881, 2013.

[5] B. Gasnier, "Characterization of low- and high-affinity glucose transports in the yeast Kluyveromyces marxianus," *BBA - Biomembr.*, vol. 903, no. 3, pp. 425–433, 1987.

[6] G. G. Fonseca, N. M. B. De Carvalho, and A. K. Gombert, "Growth of the yeast Kluyveromyces marxianus CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 11, pp. 5055–5067, 2013.

[7] C. Löser, T. Urit, and T. Bley, "Perspectives for the biotechnological production of ethyl acetate by yeasts," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 12, pp. 5397–5415, 2014.

[8] A. G. Cordente, C. D. Curtin, C. Varela, and I. S. Pretorius, "Flavour-active wine yeasts," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, no. 3, pp. 601–618, 2012.

[9] S. Y. Sun, H. S. Gong, X. M. Jiang, and Y. P. Zhao, "Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines," *Food Microbiol.*, vol. 44, no. 5, pp. 15–23, 2014.

[10] C. Löser, T. Urit, F. Nehl, and T. Bley, "Screening of Kluyveromyces strains for the production of ethyl acetate: Design and evaluation of a cultivation system," *Eng. Life Sci.*, vol. 11, no. 4, pp. 369–381, 2011.

MICROESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS.

Guzmán-Othón, D., Dávila-Vázquez, G., Bravo-Madrigal, J. y *Cervantes-Martínez, J.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México. CP 44270.

*Autor para correspondencia: cervantes@ciatej.mx

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

La identificación bacteriana es una tarea de gran interés, en varios campos de tales como; clínico, inocuidad alimentaria e impacto ambiental. En consecuencia, son de interés general estrategias nuevas e innovadoras que permitan identificar microorganismos en menor tiempo. El énfasis principal de este trabajo es sobre aspectos importantes de la aplicación de la espectroscopia Raman para la detección de bacterias anaerobias, debido a su metodología no destructiva y rápida. Los espectros Raman contienen información multidimensional de todos los principales compuestos presentes en las células bacterianas. Presentamos un método de identificación basado en la microspectroscopia Raman. Con este enfoque mostramos que es posible obtener espectros Raman directamente de microcolonias microbianas de dos cepas control ATCC *Clostridium Pasteurianum* 6013 y *Clostridium Beijerinckii* 8260, identificando las bandas espectrales características de cada una de las bacterias. Se utilizó un micro-espectrómetro Raman para obtener espectros de las bacterias, para este propósito se utilizo un tiempo de integración de 10 s, con un objetivo de 40X y con un láser de longitud de onda de excitación de 785 nm a una potencia de salida de 70 mW, como soporte se utilizó un sustrato comercial (Klarite®) de superficie ampliada del esparcimiento Raman (SERS, por sus siglas en inglés) activo con nanoparticulas de oro al cual se le agrego 1 µl de la suspensión bacteriana en agua inyectable. Las bacterias fueron irradiadas con el láser a través del objetivo del microscopio. Se obtuvieron espectros con buena relación señal / ruido. Las bacterias a pesar de pertenecer al mismo género, mostraron diferentes espectros. Varias señales características de diferentes moléculas fueron detectadas para cada especie. En comparación con otros métodos para el análisis Raman, con la microespecroscopia Raman y el uso de un sustrato comercial (Klarite®) con nanoparticulas de oro se obtuvo valiosa información espectral correspondiente a la estructura química de las bacterias en un tiempo corto y sin la necesidad de proceso de preparación complejo.

Palabras clave: Espectroscopia Raman; Micro-espectrómetro Raman; *Clostridium Beijerinckii; Clostridium Pasteurianum.*

REFERENCIAS

[1] Kneipp J, Kneipp H, Kneipp K (2008) SERS, una herramienta de una sola molécula y nanoescala para bioanálisis. Chem Soc Rev 37 (5): 1052-10604

[2] Pahlow, Susanne, Susann Meisel, Dana Cialla-May, Karina Weber, Petra Rösch, and Jürgen Popp. "Isolation and Identification of Bacteria by Means of Raman Spectroscopy." Advanced Drug Delivery Reviews 89 (2015): 105-20.

[3] Buitron, G., and Carvajal, C. "Producción De Hidrógeno a Partir De Aguas Residuales." Revista Digital Universitaria. UNAM, 10 (2009).

RELACIONES FILOGENETICAS DE MICROORGANISMOS Y PLANTAS DENTRO DEL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEINA Y COBALAMINA MEDIANTE EL ANÁLISIS.

Valle-Hernández, S. y *Brena-Becerril, A.

1. Universidad Politécnica de la zona metropolitana de Guadalajara, Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 # 595 carretera Tlajomulco Santa Fe, Lomas de Tejeda. Tlajomulco de Zúñiga Jal. México.

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

La vitamina B 12 cuenta con la estructura química más grande y compleja de todas las vitaminas es única entre las vitaminas debido a que contiene un ion metálico, el cobalto. El cobalto pertenece a la familia de los oligoelementos y a su vez se clasifica en ultra oligoelementos, cumple funciones de cofactor en enzimas como peptidasas y ribonucleótido peptidasas (síntesis de ADN), además es coenzima de las cobalaminas El termino cobalamina está vinculado a una familia de compuestos determinados, en la que se encuentra la vitamina B6 la cual está constituida por un sistema de anillo de corrina unidos a un átomo de cobalto central constituyendo una configuración casi plana. En cuestión de condiciones fisiológicas existe 3 tipos de proteínas que se adhieren a la vitamina B12 para su correcta absorción; la haptocorrina, el factor intrínseco y la transcobalamina debido a que casi nunca se encuentra en forma libre. Este último compuesto es elaborado por microorganismos que coexisten en simbiosis con las raíces de las plantas. El objetivo de este trabajo es relacionar la molécula de cobalamina con secuencias homologas de otros microorganismos y plantas precursores de este compuesto, con ayuda de programas bioinformáticos como NCBI, usando como sonda: homocisteina metiltranferasa [Bacillus anthracis] ANR59698.1, se obtuvo una colección de microorganismos, y con la sonda Arabidopsis thaliana OAO94672.1 el fichero de plantas ,el programa Bioedit permitió hacer los alineamientos correspondientes El análisis bioinformático se desarrolla en el laboratorio de computo de la Universidad politécnica de la zona metropolitana de Guadalajara desde Mayo hasta Julio del 2017. Desde un punto de vista biotecnológico es de gran interés esta proteína porque su disminución en el cuerpo humano afecta de manera considerable en diferentes rangos de edades provocando el desarrollo de enfermedades neurológicas y cardiovasculares, por lo que el conocer homólogos productores a través del análisis bioinformático permitirá inferir de una manera más profunda sus funciones previamente mencionadas.

Palabras clave: Homocisteína; Cobalamina; Relaciones evolutivas; Enfermedades neurológicas.

REFERENCIAS

[1] Clarke R, Collins R.1998. Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease. J Cardiovasc Risk 1998; 5:249-255. (Julio-2017).

[2] de Bree A, Verschuren WMM, BjorkeMonsen A-L, van der Put NMJ, Heil SG, Trijbels FJM, Blom HJ. 2003. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C_T mutation on the relations

among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. Am J Clin Nutr 2003; 77:687-693. (julio-2017).

[3] Mariela F, Irma G, Hortencia G. 1999. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. Instituto de Hematologia e inmunología. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1999;15(3):159-74.p.p 160-172

DETECCIÓN POR UN SISTEMA ELISA DEL CONTAMINANTE EMERGENTE ESTREPTOMICINA EN AGUA RESIDUAL.

*Chávez-Vela, N.A., Salinas-Miralles, E.Ma., Jáuregui-Rincón, J., Medina-Ramírez, I.E., Flores-Montañez, L., Moreno-Córdova, E.V. y Moreno-Hernández, D.J.L.

1.Universidad Autónoma de Aguascalientes, , Dpto. de ingeniería Bioquímica, Av. Universidad # 940, Cd. Universitaria, C.P.20131, Aguascalientes, Ags.

*Autor para correspondencia: nachavez@correo.uaa.mx

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

En la actualidad se ha presentado un gran desarrollo tecnológico el cual que ha beneficiado a la humanidad en diversos aspectos pero que ha causado daños en otros. Uno de estos beneficios son los fármacos, que han ayudado a tener una mejor salud y calidad de vida, sin embargo, el uso de estos ha repercutido en el medio ambiente ya que los fármacos son desechados sin tratar, de manera tal que ingresan a las plantas de tratamiento de aguas residuales. Este tipo de contaminantes así como otros productos farmacéuticos, de cuidado personal, surfactantes, y una gran variedad de productos químicos, se conocen como contaminantes emergentes. Así pues, una de las principales fuentes de contaminantes emergentes son las aguas residuales que no reciben ningún tratamiento y los efluentes de plantas tratadoras de aguas, las cuales no están diseñadas para tratar este tipo de sustancia y no está reglamentados por la mayoría de los países. Dentro de los antibióticos se encuentran los aminoglucósidos, que son ampliamente usados debido a su bajo costo, alta solubilidad en agua y actividad a pH alcalino. De esta familia deriva la estreptomicina, utilizada en el área médica, en veterinaria, en agricultura, en la industria alimentaria e investigación. Sin embargo, las principales consecuencias de su uso involucran nefrotoxicidad, ototoxicidad y el desarrollo de cepas bacterianas resistentes. Los métodos para la detección de antibióticos en aguas residuales, utilizan equipos costosos, se requiere de cuidados especiales y requieren además el empleo de varias horas por análisis de muestra. Debido a que los inmuno ensayos son métodos rápidos, sencillos, de bajo costo y sensibles, el objetivo de este trabajo fue el desarrollar y validar un inmunoensayo capaz de reconocer a la STR en muestras de agua residual, previo y posterior a su tratamiento. Para ello, y pensando en las diferentes condiciones a las que podría verse sometido el antígeno, ocasionando cambios en sus epítopos, se emplearon anticuerpos policlonales anti-STR previamente obtenidos en el laboratorio. En base a los resultados obtenidos de desarrollar un inmunoensayo cualitativo (dot blot), se llevó a cabo la estandarización y validación de un sistema ELISA tipo sándwich, con el que se logró detectar STR en un tiempo total de análisis de 3.5-4.0 h, con una sensibilidad de hasta 0.1% (p/v), siendo un método exacto, preciso, reproducible; específico para aminoglucósidos, dado que los anticuerpos empleados no fueron reactivos ante antibióticos no aminoglucósidos, además de ser más barato y sencillo de realizar que los métodos convencionales, permitiendo además analizar varias muestras de agua al mismo tiempo.

Palabras clave: Estreptomicina; contaminante emergente; sistema ELISA.

REFERENCIAS

[1] Sauvé, S. and Desrosiers, M. (2014) A review of what is an emerging contaminant. Chem Cent J, 8 (15).

[2] Hnasko, R. (2015). ELISA: Methods and protocols. New York. Human Press.69-78.

[3] ICH EXPERT WORKING GROUP, CH Harmonised Tripartite Guideline Q2 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).

PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES POR CEPAS PSICRÓFILAS AISLADAS DE LA ANTÁRTICA A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

Alvarez-Guzmán, C.L., Balderas-Hernández, V.E., *De León-Rodríguez, A.

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a la Presa San José 2055 Col. Lomas 4ª Sección, San Luis Potosí, SLP, CP. 78216, México.

*Autor para correspondencia: aleonr@ipicyt.edu.mx

Área del conocimiento: Biotecnología

RESUMEN

La preocupación por la sustentabilidad del uso de combustibles fósiles ha surgido a partir del agotamiento de las reservas de petróleo y de las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmosfera [1]. De entre las fuentes de energía alternativas, el hidrógeno sobresale por ser un portador energético renovable que no genera gases de efecto invernadero y libera una gran cantidad de energía durante su combustión, siendo la producción biológica un método de producción sustentable que requiere una tecnología simple. Recientemente, los estudios de producción biológica de hidrógeno se han enfocado en el uso de sustratos de bajo valor económico y con alto contenido de carbohidratos, tales como los residuos agroindustriales y de la industria de los alimentos [2]. Sin embargo, la investigación en esta área se ha enfocado mayormente en el uso de microorganismos mesófilos y termófilos. Recientemente, se ha demostrado que las bacterias antárcticas psicrotolerantes son capaces de producir hidrógeno a partir de azúcares simples, además de biocombustibles líquidos como etanol, considerado el biocombustible más importante actualmente y 2,3-butanodiol, con un gran número de aplicaciones en la industria [3]. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la capacidad de las cepas psicrófilas G088, GA051 y GA0F aisladas de la Antárctica para producir hidrógeno, etanol y 2,3-butanodiol a partir de suero de leche en polvo, melaza de caña de azúcar e hidrolizado de paja de trigo. Los experimentos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 120 mL con un medio de producción que contiene 2.75 g/L de triptona, 0.25 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de cada sustrato. El análisis de los metabolitos generados durante las fermentaciones se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución y por cromatografía de gases. Los resultados mostraron que la producción de hidrógeno a 25°C por las cepas psicrófilas fue entre 313 ± 6% y 1386 ± 67% mayor que la producción por la cepa de referencia *E. coli* WDHL. Además, la mayor producción de hidrógeno se presentó en las fermentaciones con melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, mientras que los mejores rendimientos de etanol y 2,3-butanodiol se obtuvieron con el hidrolizado de paja de trigo. Este estudio demuestra el potencial que presentan los microorganismos psicrófilos en el área de biocombustibles al producir de forma simultánea diferentes biocombustibles utilizando sustratos económicos a temperatura ambiente.

Reconocimientos. Problemas Nacionales 247498 y SENER-CemieBio 249564.

Palabras clave: Bacterias psicrófilas; residuos agroindustriales; hidrógeno; etanol y 2,3-butanodiol.

REFERENCIAS

[1] I. Ntaikou, G. Antonopoulou, and G. Lyberatos, "Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review," Waste and Biomass Valorization, vol. 1, no. 1, pp. 21-39, 2010.

[2] S. Phillips, "Technoeconomic analysis of a lignocellulosic biomass indirect gasification process to make ethanol via mixed alcohols synthesis," Industrial & Engineering Chemistry Research, vol. 46, no. 26, pp. 8887-8897, 2007.

[3] C. L. Alvarez-Guzmán, E. Oceguera-Contreras, J. T. Ornelas-Salas, V. E. Balderas-Hernández, and A. De León-Rodríguez, "Biohydrogen production by the psychrophilic G088 strain using single carbohydrates as substrate," International Journal of Hydrogen Energy, vol. 41, no. 19, pp. 8092-8100, 2016.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PEROXIDASAS LIGNINOLITICAS PRESENTES EN HONGOS DE PUDREDUMBRE BLANCA PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS FULVICOS A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELUOSICOS Y SU POSTERIOR UTILIZACIÓN COMO ANTIOXIDANTE NATURAL. (BIOINFORMATICAL ANALYSIS OF LIGNINOLYTIC PEROXIDASES PRESENT IN WHITE DAISY FUNGI FOR THE OBTAINATION OF FULVIC ACID FROM LIGNOCELUOSIC RESIDUES AND THEIR SUBSEQUENT USE AS A NATURAL ANTIOXIDANT).

[1]Mejía-Baez L. y [1*]Brena Becerril, A.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 # 595 carretera Tlajomulco-Santa Fe, Lomas de Tejeda. Tlajomulco de Zúñiga Jal. México.

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

La enzima peroxidasa ligninolítica (Lips) es una enzima oxidativa extracelular capaz de degradar materia lignocelulósica, se encuentra presente en hongos de pudrición blanca denominados basidiomicetos[1]. Según Minami et al[2] este tipo de hongos actúan de forma no específica a través de la generación de radicales libres de lignina, degradando la materia hasta producir ácidos fúlvicos (AF) reportados como excelentes neutralizadores de "radicales libres", causantes de la desorganización de las membranas celulares[3], por lo que es una fuente antioxidante actualmente muy utilizada. En este trabajo los algoritmos BLASTP, PSI-BLAST y DELTA-BLAST fueron ejecutados utilizando una secuencia caracterizada de C0IW58.1 Peroxidasa ligninolítica para encontrar homologías en diferentes especies de hogos, con el fin de relacionar en un árbol diferentes proteínas y generar relaciones filogenéticas que pudiesen proporcionar información sobre mayor rendimiento de enzimas peroxidasas ligninolíticas. Presentamos homologías filoproteicas del análisis de 51 secuencias distintas reunidas de la base de datos del NCBI. Los alineamientos múltiples, y los árboles de mínima evolución fueron construidos mediante ClustalX, BioEdit y Mega. Los datos inferidos del árbol indican la amplitud de la familia de C0IW58.1. Además de la información evolutiva, este trabajo nos dará herramientas de predicción funcional utilizando secuencias y la posibilidad de mejorar estrategias de esta proteína mediante recombinación.

Palabras clave: Ácidos fúlvicos, Residuos lignocelulósicos, *Phanerochaete chrysosporium*, peroxidasas ligninolíticas (Lips).

REFERENCIAS

[1] 1 QUINTERO, J. C., Gumersindo, F. C., & LEMA, J. M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. Vitae, 13(2).

[2] Minami, M., Suzuki, K., Shimizu, A., Hongo, T., Sakamoto, T., Ohyama, N., ... & Irie, T. (2009). Changes in the gene expression of the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium due to the addition of atropine. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 73(8), 1722-1731.

[3] Almendros, G., Polo, A., Lobo, M. C., & Ibáñez, J. J. (1984). de la materia organica del suelo II.–Transformaciones del humus por ignición. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, *21*(2), 145-160. [3] Coro-Arizmendi, M., 2009. La crisis de los polinizadores. CONABIO. Biodiversitas, 85: 1-5.

RELACION DE HOMOLOGÍA DEL POLIFENOL-FLAVONOIDE MIRICETINA DE EFECTO ANTIOXIDANTE EN LAS BERRIES PARA ENCONTRAR FUENTES ALTERNATIVAS DE PRODUCTOS ANTIOXIDANTES Y BIOMEDICAMENTOS.

Paz-Macías, J.M. y Brena-Becerril, A*.

1. Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 N°595 carretera Tlajomulco-Santa Fe, Lomas de Tejeda, Tlajomulco Jalisco.
2. Profesor "Titular B" del Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Jalisco. Plantel Tlajomulco de Zúñiga. Km. 3.2 Carretera a San Isidro Mazatepec.

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com, abrena.cecytej@gmail.com.

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

Las berries son conjunto de frutos ricos en antioxidantes que, además de poseer un buen sabor, tienen cualidades nutricionales importantes, las han certificado como productos importantes para la prevención y tratamiento de algunas patologías. son alimentos muy saludables por su composición de antioxidantes, vitaminas, minerales y oligoelementos. Una Molécula causante de estos efectos es la Miricetina, un flavonoide, una clase de compuesto polifenólico (Ong KC y col., 1997), con propiedades antioxidantes que constituyen uno de los metabolitos secundarios de las plantas, más numerosos (Feldman y col., 1999). Los polifenoles naturales pueden ir desde moléculas simples (que es el caso de la Miricetina) hasta compuestos altamente polimerizados. Jalisco lidera la producción nacional de arándano. En este trabajo buscamos las relaciones de homología de Miricetina para encontrar fuentes alternativas de productos antioxidantes para luego transformarlo en un biofármaco. Se utilizaron las herramientas bioinformáticas ClustalX, BioEdit y Mega4, así como páginas especializadas en bioinformática como NCBI. Se espera contar con mayor información para extraer el polifenol Miricetina ($C_{15}H_{10}O_8$) presente en las berries para encontrar fuentes alternativas de productos antioxidantes y convertirlos en un biomedicamento.

Palabras clave: Berries, antioxidante, Polifenoles, Flavonoide, Miricetina, Bioinformática.

REFERENCIAS

[1] S. Arranz, F. Saura-Calixto, S. Shaha, y P. Kroon, "High Contents of Nonextractable Polyphenols in Fruits Suggest That Polyphenol Contents of Plant Foods Have Been Underestimated". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009.

[2] Feldman, K. S, Sahahrabudhe K, Simith R. S, Sheuchenzuber. 1999. Immunostimulation by plant polyphenols: A relationship between tumor necrosis factor- production and tannin structure. Bioorganic & Medical Chemistry.

[3] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). "Basic Local Alignment 11 Search Tool", J. Mol. Biol. (215), 403-410.

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LIPOPÉPTIDOS EN *Bacillus subtilis* BD2-22.

Graciano-Martínez, D., Castañeda-Mejía, F.A., Macedo-Raygoza, G.M., Peralta-Mendoza J. A., Balleza-Mejía, D. y Beltrán-García, M.J.

Departamento de Química-ICET, Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor para correspondencia: danielagraciano.mtz@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología.

RESUMEN

Los lipopéptidos (LP) son compuestos extracelulares derivados del metabolismo secundario de una gran variedad de microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. En la última década han ganado mucha importancia en diferentes sectores industriales, debido a la diversidad estructural que existe entre estas moléculas, la cual confiere funciones químicas y bioquímicas específicas, tales como actividad anti fúngica, antiviral y antitumoral. En este proyecto se trabajó con una cepa de *Bacillus* aislado de semillas del Agave angustifolia. Para comprobar la actividad antifúngica de *bacillus subtilis* BD2-22 se realizaron pruebas de inhibición para dos diferentes hongos patógenos Fusarium oxyporum que afecta los cultivos de plátano y Alternaría sp. un patógeno distribuido en muchas plantas. Por medio de PCR punto final se determinó la presencia de los genes relacionados con la síntesis de lipopéptidos. Para conocer el comportamiento de *bacillus subtilis* realizamos una cinética de crecimiento, con el fin de determinar en qué tiempo aumenta la síntesis de lipopéptidos. Los lipopéptidos fueron identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF. El principal lipopetido identificado fue la surfactina. Los lipopetidos son una alternativa biológica para el control de plagas en cultivos.

Palabras clave: Lipopeptidos*; Bacillus.*

REFERENCIAS

[1] M. Ongena and P. Jacques, “Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol,” Trends Microbiol., vol. 16, no. 3, pp. 115–125, 2008.

[2] E. Beltran-gracia et al., “Production of of Lipopeptides Lipopeptides by by Fermentation Fermentation Processes : Processes : Production Endophytic Bacteria , Fermentation Strategies and Easy Endophytic Bacteria , Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection Met,” 2017.

APLICACIÓN DE UNA MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO PARA DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS SINTÉTICAS.

[1*]Serrano, M., [1]Garzón, G., [1]Pedraza, J. y [2]Ríos, F.

1. Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente
2. Grupo de Investigaciones en Corrosión, Universidad Industrial de Santander

*Autor para correspondencia: magda.serrano@correo.uis.edu.co

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

El fenol (C6H5OH) es un compuesto que se caracteriza por su toxicidad y persistencia en el ambiente. Existen varias técnicas para cuantificar el fenol en agua que, si bien se caracterizan por su precisión, consumen largos tiempos de análisis y usan equipos de alto costo [1]. Una de las técnicas que ha venido ganando importancia debido a que permite obtener resultados en tiempo real es la Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) [1,2]. Para mejorar la sensibilidad de la técnica, se emplean recubrimientos sobre la superficie del electrodo de cristal de cuarzo, entre ellos el polimetilmetacrilato (PMMA). Así, el objetivo principal de trabajo es determinar en tiempo real la concentración de fenol en agua utilizando una QCM con PMMA como recubrimiento. Este trabajo se realizó en dos etapas principalmente: 1. Selección de una película de PMMA para usar como recubrimiento, y 2. Determinación de la concentración de fenol usando la película seleccionada en la Etapa 1. Los resultados mostraron que las películas de PMMA presentaron una mayor uniformidad al emplear dicloroetano como disolvente. Una concentración de PMMA/1,2 dicloroetano de 0,2% p/v permitió una mayor sensibilidad en un menor tiempo de respuesta. Finalmente, un aumento de la concentración de fenol produjo un incremento en los cambios en la frecuencia del cristal de manera lineal.

Palabras clave: Fenol; QCM; agua; tiempo real; polimetilmetacrilato.

REFERENCIAS

[1] Mirmosheni, A., Oladegaragoze, A. Application of the quartz crystal microbalance for determination of phenol in solution. 2003. Sensors and Actuators, B: Chemical, Vol.98 (1), p. 28-36.

[2] Reddy, S. Detection of phenol in aqueous solution using an AT-cut quartz thickness shear mode sensor. 2000. Materials Science and Engineering C, Vol. 12 (1), p. 23-28.

DESMINERALIZACIÓN DE LACTOSUERO DULCE BOVINO DE LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA, JALISCO POR MEDIO DE RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO.

[1]Roque-Betanzos, H.E., [1]Ramírez-Frausto, C., [1]García-Parra, M.D., [1*]Prado-Ramírez, R., y [2]Escalante-García, Z.Y.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019, Zapopan, Jalisco.
2. Centro Universitario de Ciencias exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara. Av. Marcelino García Barragán 1421, C.P. 44430. Guadalajara, Jalisco.

*Autor para correspondencia: rprado@ciatej.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN
El lactosuero bovino es el remanente líquido derivado del proceso de elaboración del queso. Se le conoce como lactosuero dulce cuando por adición de una enzima coagulante en la leche se desestabiliza a la caseína haciéndola precipitar, alcanzando con ello un valor de pH de entre 6.5 a 5.8 unidades, mientras que si la caseína precipita por la adición de ácidos orgánicos hasta llegar a su punto isoeléctrico a un pH de 4.6 unidades, entonces es llamado lactosuero ácido. El lactosuero también posee componentes nutritivos como lactosa, proteínas, vitaminas y minerales, por lo que en aras de su aprovechamiento se ha optado por tecnologías que permitan su separación. En este trabajo en concreto, se evaluó la desmineralización del lactosuero por medio de resinas de intercambio iónico, ya que esta operación unitaria no solo es capaz de adsorber los minerales en solución hasta en un 90%, sino que además, al reducirse la carga mineral del lactosuero, el intercambio iónico constituye también un proceso de purificación, dando lugar a la obtención de productos como: fórmulas infantiles, alimentos para bebes, leches reconstituidas o incluso confitería, así mismo, la capacidad regenerante de las resinas, hacen del intercambio iónico un proceso eficiente.

Palabras clave: Lactosuero bovino, resinas de intercambio iónico, desmineralización

INTRODUCCIÓN

El lactosuero bovino es un subproducto derivado de la producción quesera, contiene carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, mismos que le confieren un conjunto de propiedades nutritivas de gran valor [1], sin embargo, dicha composición nutricional es también la causante de que posea una carga orgánica elevada, constituida por una demanda bioquímica de oxígeno de 40,000 a 60,000 ppm y una demanda química de oxígeno de 50,000 a 80,000 ppm. Su carga orgánica es tal que estudios refieren que una planta procesadora de queso que produzca diariamente 400,000 L de suero sin depurar, estaría generando una contaminación diaria equivalente a la de una población de 1,250,000 habitantes [2], esto hace que el aprovechamiento del lactosuero venga a ser una necesidad apremiante. Para mitigar esta falta de aprovechamiento, al lactosuero lo han usado como alimento para animales, para riego de cultivos agrícolas o simplemente se le lleva a una planta tratadora de aguas residuales para su depuración y descarga posterior, desde luego que estos usos están lejos de ser formas de

aprovechamiento adecuadas para el lactosuero, ya que como tal sólo corresponden a formas menos contaminantes de desecharlo [3]. Por otra parte, en las últimas décadas se han desarrollado diversas tecnologías de separación que han impulsado el aprovechamiento del lactosuero en una forma única y eficiente, pues tal y como su nombre lo indica estas tecnologías permiten la separación individual de cada uno de sus componentes, de tal manera que a partir de estos se pueden obtener productos con valor agregado en el mercado. El objetivo de este estudio consistió en evaluar la desmineralización por lotes de un lactosuero dulce bovino proveniente del municipio de Zapopan Jalisco, mediante resinas de intercambio iónico, ya que la desmineralización purifica al lactosuero permitiendo, potencialmente, la obtención de infinidad de productos, como los aislados de proteína [4]. Para dicho fin el lactosuero se puso en contacto con una resina activada en su forma ácida (Dowex™Monosphere™ 88) y posteriormente con una resina adsorbedora de aniones en su forma básica (Lewatit® S 4268), durante un periodo de 0.75-1.00 h, hasta que ambas resinas alcanzaron su saturación, la cual ocurre una vez que todos los sitios activos de las resinas son ocupados por los cationes y aniones presentes en el lactosuero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y recepción del lactosuero

Se recolectaron 5 L de lactosuero dulce bovino provenientes de una quesería local ubicada en el municipio de Zapopan Jalisco, los cuales se recibieron separadamente en botellas de vidrio estériles y selladas herméticamente de 1 L de capacidad cada una. Una vez embotelladas, las muestras de lactosuero fueron almacenadas a una temperatura de refrigeración de 4ºC, por espacio de 30 minutos previo a su procesamiento.

Análisis fisicoquímico del lactosuero dulce bovino

Para esta caracterización del lactosuero dulce bovino, fueron considerados los parámetros fisicoquímicos pH, acidez (desarrollada), conductividad eléctrica, grados °Brix, color (L*, a* y b*), sólidos totales (en porcentaje), cenizas (en porcentaje), humedad (en porcentaje) y densidad. Los análisis fueron realizados a escala laboratorio por triplicado empleando los métodos y normas que se enuncian a continuación:

Tabla 1. Análisis fisicoquímicos de lactosuero dulce bovino

Parámetro y dispositivo	Método analítico	Norma de referencia
pH (Potenciometro: Thermo Fisher Scientific Orion Star™ A211)	Potenciometría	NMX-AA-008-SCFI-2016
Acidez (Titulador semiautomático)	Titulación	NMX-F-102-NORMEX-2010
Conductividad eléctrica (Conductímetro: Hach SensION 5)	Conductimetría	NMX-AA-093-SCFI-2000
Grados brix (Refractometro: Atago Hand-Held Refractometer N-1 brix 0.32%)	Refractometría	NMX-F-103-NORMEX-2009
Color (Espectrofotómetro: Bench-top Spectrophotometer CM-5	Espectrofotometría (CIELAB)	NMX-F-526-SCFI-2012
Sólidos totales (Horno para secado: NOVATECH de acero inoxidable)	Evaporación	NMX-AA-034-SCFI-2015

Cenizas (Mufla: FELISA FE-340 MUFLA DE LABORATORIO 110ºC)	Incineración	NMX-F-607-NORMEX-2013
Humedad (Horno para secado: NOVATECH de acero inoxidable)	Evaporación	NMX-F-083-1986
Densidad (Probeta volumétrica de 100 ml, balanza digital y micropipeta de 1000 microlitros)	Picnometría	NMX-F-075-SCFI-2012

Análisis microbiológico del lactosuero dulce bovino

Para esta caracterización del lactosuero dulce bovino, fueron considerados los consorcios microbianos: Bacterias acidolácticas (BAL), Bacterias mesófilas aerobias (BMA), Coliformes totales (CT), Y Hongos y Levaduras (HYL). Los análisis fueron realizados a escala laboratorio y además por duplicado bajo los métodos y normas que se enuncian a continuación:

Tabla 2. Análisis microbiológico de lactosuero dulce bovino

Consorcio	Método	Norma de referencia
BAL	Extensión en superficie (Camacho y col. 2009)	NOM-109-SSA1 y NOM-110-SSA1 1994
BMA	Recuento de colonias en placa con medio seco rehidratante, sistema doble película.	AOAC 990.12
CT	Recuento de colonias en placa con medio seco rehidratante, sistema doble película.	AOAC 986.33
HYL	Recuento de colonias en placa con medio seco rehidratante, sistema doble película.	AOAC 2014.05

Pretratamiento del lactosuero dulce bovino por microfiltración

Previo a ser desmineralizado por las resinas de intercambio iónico, el lactosuero dulce bovino fue sometido a un pretratamiento, el cual consistió esencialmente en un proceso de microfiltración convencional a través de membranas semipermeables de tres tamaños de poro (10 μm, 3 μm y 0.8 μm), además del uso de un compresor de aire cuya función fue ejercer la caída de presión correspondiente para la obtención de un permeado de lactosuero más limpio en su composición microbiológica. Una vez microfiltrado y con la finalidad de mitigar cualquier crecimiento bacteriano dada la manipulación

posterior que este tendría durante el proceso de intercambio iónico, al lactosuero se le añadió un conservador de carácter bacteriostático en una proporción equivalente al volumen de lactosuero permeado, que para este caso fue de 1L. Cabe mencionar que cada una de las etapas del pretratamiento es decir tanto el proceso de microfiltración del lactosuero así como la adición del conservador sobre el lactosuero permeado, se realizaron dentro de una campana de flujo laminar, brindándose así la esterilidad adecuada para cada operación.

Tabla 3. Condiciones de operación de pretratamiento por microfiltración

Equipo/Material	**Operación/Función**	**Condiciones de operación**
Equipo de filtración (EMD Millipore, 142 mm Hazardous Waste Pressure Filter System).	Microfiltración convencional	Volumen= 1L Ø= 142 mm. Sistema de presión positiva.
Membranas semipermeables (Papel filtro de celulosa de 10 y 3 μm). (Millipore de 0.8 μm y 142 mm.)	Retención y permeado	Ø= 10 μm; desnatado Ø= 3 μm; desnatado Ø= 0.8 μm; remoción bacteriana Volumen permeado = 1L
Compresor (Compresor de aire Goni. 1.5 hp, 24 L de capacidad.)	Fuerza impulsora	Δp= 0.5 a 2 bar
Conservador Bacteriostático(Citrogen M Gold, presentación liquida de 1L de capacidad).	Atenuar crecimiento bacteriano.	Proporción añadida: 0.02% del volumen de lactosuero permeado.
Campana de flujo laminar	Esterilidad	

Desmineralización del lactosuero dulce bovino por medio de resinas de intercambio iónico:

Para la desmineralización del lactosuero dulce bovino, se realizaron secuencialmente dos intercambios iónicos, el primero de ellos consistió en un intercambio catiónico en el cual por medio de la resina catiónica fuerte Dowex™Monosphere™ 88 se lleva a cabo la adsorción de los cationes del lactosuero, después de lo cual se espera que el pH disminuya. Por otra parte el segundo paso consistió en un intercambio aniónico en donde esta vez por medio de la resina aniónica débil Lewatit® S 4268, se lleva a cabo la adsorción de los aniones presentes en el lactosuero que ha sido decationizado, ocasionando que al final de este segundo intercambio el pH del lactosuero aumente. No obstante la capacidad desmineralizadora de cada una de las resinas intercambiadoras, estas debieron ser previamente activadas o regeneradas para su utilización según fue requerido. Al igual que durante la etapa de activación el contacto entre las resinas y el lactosuero permeado, se efectuó por agitación por espacio de 1h, tiempo en el cual las resinas alcanzaban la saturación de sus sitios activos. Cabe aclarar, que además de desmineralizar al permeado de lactosuero que se obtuvo después del proceso de microfiltraciòn, al mismo tiempo también se lleva a desmineralizar otra muestra de lactosuero identificada lactosuero blanco, esto para fines de comparación, la cual al igual que el lactosuero permeado fue microfiltrada por 10 y 3 μm, además de tampoco haber sido adicionada con el conservador de carácter bacteriostático.

Activación de las resinas de intercambio iónico

La activación de las resinas de intercambio iónico se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones señaladas por cada proveedor. Para la activación de la resina catiónica fuerte Dowex™Monosphere™ 88, se preparó y se utilizó una solución de HCl al 7% p/p, mientras que para la activación de la resina anicónica débil Lewatit® S 4268, se preparó y se utilizó una solución de NaOH al 4% p/p. En ambos casos el mecanismo de activación consistió en mezclar volúmenes proporcionalmente definidos de las resinas con sus respectivas soluciones activadoras, las mezclas se hicieron agitar durante un periodo de tiempo de 0.75 a 1 h, a una velocidad de agitación tal que permitiera un contacto total entre las resinas y las soluciones activadoras, de tal manera que las resinas intercambiadoras fuesen correctamente activadas.

Regeneración de las resinas de intercambio iónico

Una vez que todos los sitios activos de las resinas intercambiadoras fueron ocupados por los cationes y aniones presentes en el lactosuero permeado, es decir, que se han saturado las resinas, estas debieron ser regeneradas para poder ser utilizadas de nueva cuenta en lo que sería un nuevo proceso de desmineralización. El mecanismo de regeneración de las resinas de intercambio iónico es prácticamente idéntico a su mecanismo de activación, por lo que bien podría decirse que la regeneración es en sí misma, un proceso de reactivación de las resinas.

Lavado de las resinas de intercambio iónico

Una vez activadas las resinas de intercambio iónico, fue necesario realizar un lavado con la finalidad de eliminar cualquier impureza que pudieran tener, no solamente dadas las soluciones activadoras utilizadas en ellas, sino también por cualquier partícula contaminante del exterior. El lavado consistió en utilizar agua destilada, toda vez que se trata de un compuesto libre de iones, de tal manera que al ser enjuagadas con agua destilada, la conductividad eléctrica de las resinas fuera disminuyendo gradualmente. Cuando la conductividad eléctrica en las resinas alcanzó un valor cercano a 1 µs/cm, se consideraron limpias, activadas y por lo tanto, listas para usarse.

Tabla 4. Condiciones de operación de desmineralización por resinas de intercambio Iónico

Equipo/Material	**Operación/Función**	**Condiciones de operación**
Resina catiónica fuerte(Dowex™Monosphere™ 88	Adsorción de cationes	2 BV= 1000 ml solución/500 mL de resina
Resina aniónica débil (Lewatit® S 4268)	Adsorción de aniones	2 BV= 1000 mL solución/500 mL de resina
solución de HCl al 4% p/p	Activación de resina catiónica fuerte	70 mL de HCl/ 1000 mL de agua destilada.
solución de NaOH al 7% p/p	Activación de resina aniónica débil	40 mL de NaOH/ 1000 mL de agua destilada.
Agitador Magnético (ZEIGEN)	Agitación de soluciones	Volumen máximo de agitación = 2L

Mosca magnética de agitación	Agitación de soluciones	
Agua destilada	Lavado de resinas	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 1 a 9, se muestran los resultados obtenidos en cada parámetro fisicoquímico, cuyos valores son el promedio de un análisis realizado por triplicado. Por otra parte en las figuras 10 a 14 se muestran en forma gráfica, los resultados obtenidos en cada grupo microbiano cuyos recuentos son el promedio de un análisis por duplicado.

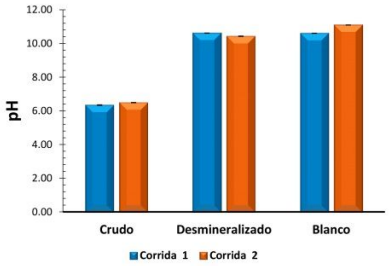


Figura 1. PH en las muestras de lactosuero.

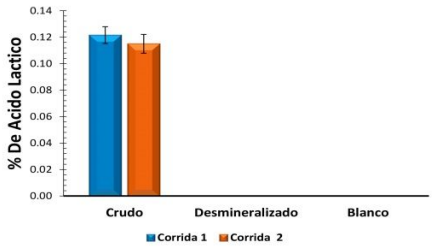


Figura 2. Acidez en muestras de lactosuero.



Figura 3. Conductividad en muestras de lactosuero.

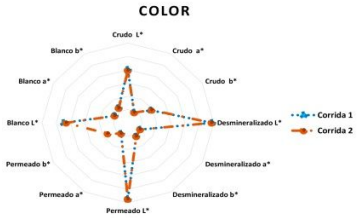


Figura 4. Color en muestras de lactosuero.

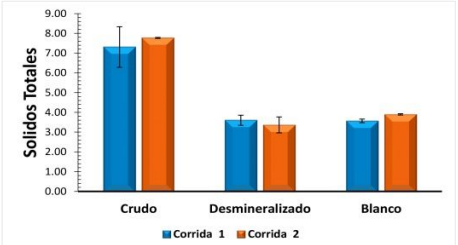


Figura 5. Solidos totales en muestras de lactosuero.

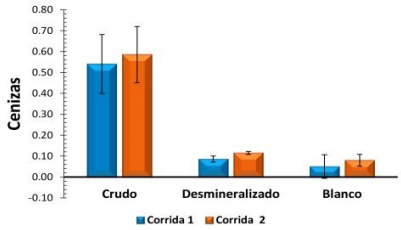


Figura 6. Cenizas en lactosuero.

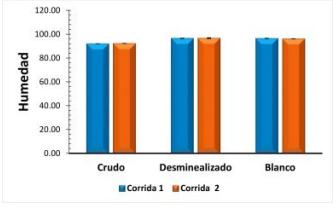


Figura 7. Humedad en muestras de lactosuero.

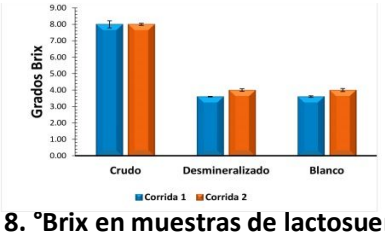


Figura 8. °Brix en muestras de lactosuero.

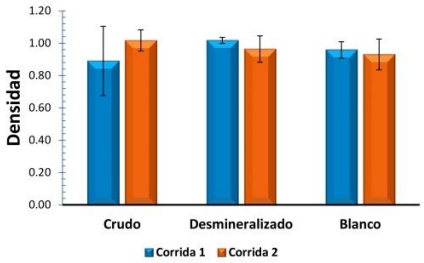


Figura 9. Análisis de densidad en las muestras de lactosuero

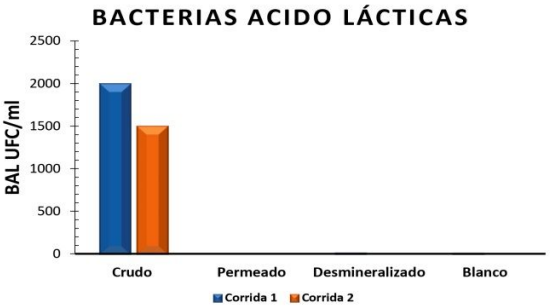


Figura 10. BAL en muestras de lactosuero.



Figura 11. BMA en muestras de lactosuero.

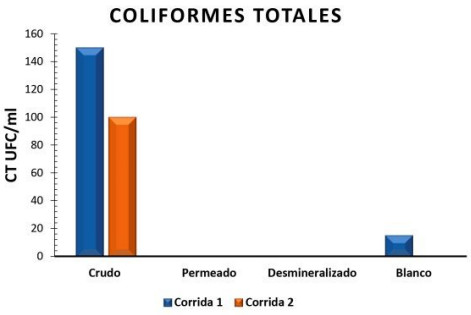


Figura 12. CT en muestras de lactosuero.

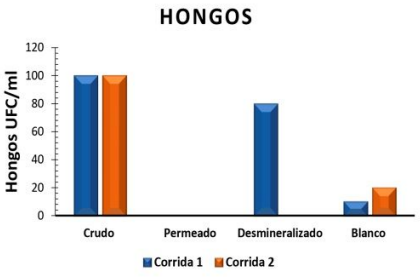


Figura 13. Hongos en muestras de lactosuero.



Figura 14. Levaduras en muestras de lactosuero

El efecto de la desmineralización por medio de resinas de intercambio iónico resultó significativo en parámetros fisicoquímicos como el pH, en donde de tener un valor de 6.41 el lactosuero crudo, este se incrementó hasta un valor de 10.62 unidades en el lactosuero desmineralizado; esto se atribuye a la capacidad que tienen las resinas tanto catiónica como aniónica de intercambiar iones H^+ e iones OH^-, respectivamente, por los cationes y aniones presentes en el lactosuero. Algunos autores como Van der Schans [5], señalan que normalmente al finalizar el proceso de intercambio iónico en el lactosuero, su pH pasa de ser ácido a un pH neutro de entre 7 u 8 unidades. En este caso, el lactosuero desmineralizado alcanzó un pH alcalino de 10.62 unidades. Cabe aclarar que tratándose de un lactosuero desmineralizado se prefieren valores de pH neutros, es por ello que la elección de las resinas debe ser selectiva, de tal manera de que se puedan evitar pérdidas indeseadas de sus componentes. En ese sentido existen procesos de desmineralización por intercambio iónico como el estudiado por Jonsson y Olsson [6], que restringen las variaciones de pH en un rango de valores de 6.5 a 8.2 unidades y en donde básicamente se realiza un intercambio iónico inverso al convencional, es decir, se utiliza primero la resina aniónica débil antes que la catiónica fuerte. Por otra parte, la conductividad eléctrica se redujo de un valor de 6966 μs/cm correspondiente al lactosuero crudo, hasta un valor de 2025 μs/cm para el lactosuero desmineralizado, lo cual se traduce en una reducción del 71 % de dicho valor. La conductividad resulta un parámetro importante en lo que a la desmineralización del lactosuero se refiere, pues está directamente relacionada con la solubilidad de las proteínas del lactosuero, Cheftel y col. [7], reportaron que cuando las proteínas del lactosuero se acercan a sus puntos isoeléctricos, estas disminuyen sus interacciones con el agua en solución y por lo tanto el paso de corriente eléctrica, con lo cual precipitan, siendo así, que a valores de pH más elevados la conductividad disminuye. En el caso de la acidez, para el lactosuero crudo se obtuvo un 0.12% de ácido láctico, correspondiente a un valor de pH de 6.41, sin embargo, respecto al lactosuero desmineralizado, dado que se alcanzó un valor de pH de 10.52 unidades y dado que la titulación para medir la acidez termina al llegar a un valor de 8.4 unidades de pH de acuerdo con Noa y Ruvalcaba [8], la titulación para medir la acidez del lactosuero desmineralizado, no pudo efectuarse adecuadamente toda vez que se trata de un valor de pH mayor. En lo referente a los grados °Brix, en el lactosuero crudo se obtuvo un valor de 8.0 ºBx, mientras que para el lactosuero desmineralizado el valor obtenido fue de 3.8 ºBx, lo que representó una reducción del 47%. Los grados Brix constituyen los sólidos solubles en el lactosuero, principalmente azucares, en donde la lactosa es el componente mayoritario al respecto, pues se encuentra en un porcentaje de composición del 4.9 %, según lo señalan Valencia y Ramírez [3]. Con base en lo anterior, se puede señalar que la reducción en grados Brix del lactosuero desmineralizado con respecto al crudo pudo estar asociada con el intercambio iónico e inclusive adsorción, pues si bien se separan los minerales del lactosuero, estos tan solo se encuentran en una composición porcentual del 0.6% [3], lo que comparado con el contenido de lactosa es un valor mucho menor, lo mismo ocurrió con el contenido de sólidos totales, pues de tener una concentración en lactosuero crudo del 7.54%, en el lactosuero desmineralizado disminuyo hasta un 3.48% obteniéndose así una reducción del 46%. El contenido de cenizas en el lactosuero, hace referencia a su contenido mineral, por lo que era previsible que después del proceso de intercambio iónico, el contenido de cenizas se redujera, muestra de ello fue que en lactosuero crudo el contenido de cenizas era de un 0.56%, y disminuyó hasta un 0.10% para el lactosuero desmineralizado, lo que representó una reducción del 82%. Por su parte, Jonsson y Olsson [6] obtuvieron un 90% y Greiter un 99% [9]. Para lo correspondiente a la densidad, para el lactosuero crudo se obtuvo un valor de densidad de 0.95 g/mL, por su parte para el lactosuero desmineralizado este valor se incrementó ligeramente hasta un valor de 0.99 g/mL pues al igual que ocurre con la humedad, ya que el agua es el componente mayoritario en el

lactosuero, sus valores de densidad tienden a ser muy cercanos a 1.00 g/mL. Finalmente al respecto del color, para el lactosuero crudo, se obtuvieron los valores: L= 59.85, a*= -1.98 y b*= 17.62, que de acuerdo al diagrama (CIELAB), sugerido por García [10], corresponde a una color traslucido entre amarillo y verdoso. Para el caso del suero desmineralizado, los valores obtenidos fueron: L= 97.98, a*= -0.11 y b*= 3.44, lo cual es un indicativo de un incremento únicamente en la luminosidad,, ya que conforme al parámetro a* sigue manteniendo su tendencia al color verde, mientras que aunque disminuyó su tendencia al color amarillo por su valor de b*, este no repercute de manera significativa en dicha tendencia. Normalmente los cambios drásticos de color en el lactosuero, estarán asociados con cuestiones de higiene inadecuada o pobre calidad del lactosuero [11].

En cuanto a la microbiología durante el proceso, se encontró que la microfiltraciòn por papel de 0.8 micras para el caso de las BAL en el lactosuero crudo, la población que se determinó fue de 2000 UFC/mL, misma que disminuyó en el lactosuero desmineralizado hasta una concentración de 15 UFC/mL lo que representa una reducción de 2 logaritmos (99.25%). Por otra parte, Carr y col. 2002, señalan que las BAL pueden tolerar valores de pH tan bajos como de 3.2 unidades y tan altos como de hasta 9.6 unidades y siendo el del lactosuero desmineralizado un valor de pH alcalino, puede ser esta otra razón de que las BAL tengan dificultad para formar colonias. Respecto a las BMA en el lactosuero crudo, la concentración obtenida fue de 400 UFC/mL, mientras que para el lactosuero desmineralizado, dicha concentración disminuyó hasta 30 UFC/mL, lo que representa una reducción de 2 logaritmos (92.5%) de su concentración de BMA, respecto al lactosuero crudo. Las BMA son capaces de tolerar valores de pH tan bajos como de 4.5 unidades y tan altos como de 9 unidades [12], por lo que un medio con pH alcalino también seria inhóspito para ellas. Para lo referente a coliformes en el lactosuero crudo, se obtuvo una concentración de 150 UFC/mL la cual disminuyó hasta una concentración de 15 UFC/mL, en el lactosuero desmineralizado lo que corresponde a la reducción de un logaritmo de concentración (90%). Al igual que las BMA las coliformes pueden tolerar valores de pH tan bajos como de 4.5 unidades y tan altos como de 9 unidades [12] y tampoco podrían proliferar en un medio alcalino. Para el caso de hongos, en el lactosuero crudo no se encontró una concentración inicial de estos y aunque en el lactosuero desmineralizado su concentración llegó a 80 UFC/mL, al representar solo 1 logaritmo de concentración, no es algo fuera de lo común. La presencia de hongos pudo obedecer a la manipulación que se dio al lactosuero durante el proceso. Los hongos pueden tolerar valores de pH tan bajos como de 2 unidades y tan altos como de 9 [12], por lo que su carácter acidófilo, podría ser una desventaja al quererse adaptar a un medio con pH alcalino. Finalmente para levaduras, en el lactosuero crudo se obtuvo una concentración inicial de 24 UFC/mL, la cual se redujo en su totalidad en el lactosuero desmineralizado. Aún con ello, Blanco [12], establece que las levaduras pueden tolerar valores de pH tan bajos como de 2 unidades y tan altos como de 11 unidades, por lo que podría sugerirse su crecimiento en medios alcalinos.

CONCLUSIONES

Las resinas de intercambio iónico utilizadas lograron una tasa de desmineralización de hasta el 82%, lo cual muestra que cumplieron con el objetivo del estudio. Lo anterior se confirma respecto al comportamiento de la conductividad del lactosuero desmineralizado pues esta se redujo en un 71% respecto a la del lactosuero crudo. Por otra parte, como un efecto secundario de la desmineralización, se observaron reducciones de la carga bacteriana, como en las BAL, las cuales se redujeron en un 92.5%. Estos resultados constituyen un panorama inicial alentador en lo que a conservación del lactosuero se refiere, sabiendo del efecto fermentativo que estas bacterias ejercen sobre él.

REFERENCIAS

[1] M. Hernández-Rojas, F J. Vélez-Ruiz, "Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales," *Temas Sel. Ing. Aliment.*, vol. 8, no. 2, pp. 13–22, 2014.

[2] J. Zamora Orozco, "Depuración biotecnológica del suero lácteo empleando un sistema continuo mixto : anaerobio de lecho fijo- aerobio TESIS Para obtener el título de Ingeniero en Alimentos, Presenta : Jeanett Zamora Orozco Director de tesis :," Universidad Tecnologica de la Mixteca, 2006.

[3] D. Valencia *et al.*, "La industria de la leche contaminación del agua," *Elem. Cienc. y Cult.*, vol. 16, no. 73, pp. 27–31, 2009.

[4] U. D. E. Council, "Reference manual for US whey and lactose products," *Arlington, VA US Dairy Export Counc.*, 2006.

[5] V. der Schans, "'Valorización del suero,'" Universidad de Ciencias Aplicadas del occidente, 2002.

[6] H. Jonsson y L. E. Olsson, "The SMR process-a new ion exchange process to demineralize cheese whey," *Milchwissenschaft*, vol. 8, no. 36, pp. 482–5, 1891.

[7] J. Cheftel, "Proteínas Alimentarias," 1989.

[8] M. Noa Pérez y S. Ruvalcaba Barrera, *Ciencia de la leche: una visión integral para México*. Guadalajara, Jal., 2011.

[9] M. Greiter, S. Novalin, M. Wendland, K. D. Kulbe, and J. Fischer, "Desalination of whey by electrodialysis and ion exchange resins: analysis of both processes with regard to sustainability by calculating their cumulative energy demand," *J. Memb. Sci.*, vol. 1, no. 210, p. 91–102., 2002.

[10] M. Garcia Bernabé, "Aptitud tecnológica de leche procedente de cabras alimentadas con subproductos de alcachofas.," 2016.

[11] J. S. Ramírez-Navas, "Diseño de procesos en Industria Láctea : Transformación de lactosuero," 2015.

[12] P. Casado y Blanco, "Métodos Instrumentales para el Análisis de la leche," *Asoc. Nac. Químicos España*, 1998.

[13] K. D. Mahrer, "Some considerations when abstracting," *Geophysics*, vol. 58, no. 1. pp. 10–11, 1993.

[14] M. Weiss y A. M. Newman, "A guide to writing articles in energy science," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 11, pp. 3941–3948, 2011.

DESARROLLO Y ESCALADO DE VALORACIONES ÁCIDO-BASE PARA FAVORECER LA ENSEÑANZA DE ESTE EQUILIBRIO EN ALUMNOS DE LICENCIATURAS DEL ÁREA QUÍMICA Y DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS.

*Botello-Pozos, J.C., Pérez-Damián, G., Reyes-Sánchez, L.B., y Morales-Galicia, M.L.

Sección de Ciencia Básica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), Av. 1º de Mayo s/n, Sta. María Las Torres, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54740 Estado de México, México.

*Autor para correspondencia: jbotello@comunidad.unam.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

Las valoraciones ácido-base son empleadas para la determinación de un gran número de sustancias y en el control de calidad fisicoquímico de múltiples productos industriales, por ello es que prácticamente todos los programas de estudio de licenciaturas del área química consideran la revisión de este tema. Sin embargo, en muchas ocasiones la aridez con que se aborda dificulta la comprensión de ello, adicional a esto las prácticas experimentales enfocadas a este tema considera, en muchas ocasiones, valoraciones de sistemas químicos preparados en laboratorio lo que evita que el estudiante haga significativo el aprendizaje. En el presente trabajo se desarrollaron valoraciones ácido-base para diferentes productos comerciales realizando la disminución progresiva de la masa o volumen de muestra a valorar teniendo siempre una adecuada determinación del punto estequiométrico, así como un manejo y conocimiento correcto de material de laboratorio por parte del alumno, para la determinación de la acidez total y para la adquisición de habilidades tanto cognitivas como motrices en la realización de técnicas volumétricas de análisis, a fin de lograr una aprendizaje significativo.

Palabras clave: Acidez, basicidad, valoraciones.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos y las bases son compuestos que se encuentran en una gran diversidad de sistemas químicos, la presencia de estas especies en algún compuesto, ya sea natural o sintético, le confiere propiedades específicas. Cabe mencionar que es de suma importancia conocer los conceptos de este tipo de equilibrios, ya que muchos métodos de cuantificación y purificación emplean a los equilibrios ácido-base como fundamento, por otro lado, muchas de las reacciones que se llevan a cabo en el campo de la química son reacciones ácido-base, sin olvidar también que muchas de estas reacciones se llevan a cabo en sistemas biológicos [1,2]. Para realizar la determinación y cuantificación de ácidos y bases en productos naturales, alimenticios e industriales se emplean valoraciones, es por esto que prácticamente los programas de estudio de licenciaturas del área química, de las instituciones de educación superior, consideran la revisión de este tema. Sin embargo, la comprensión de este en los primeros semestres de licenciatura se dificulta debido a la falta de bases académicas y a la abstracción que se requiere por parte del alumno, adicional a esto las prácticas experimentales enfocadas a este tema consideran, en muchas ocasiones, valoraciones de sistemas químicos preparados en laboratorio lo que evita que el estudiante haga significativo el aprendizaje. Este trabajo propone un conjunto de valoraciones para determinar la acidez o basicidad, con escalado en la cantidad de masa o volumen de muestra a analizar

con el propósito de disminuir la cantidad de reactivos, minimizar la cantidad de residuos y conservar la adquisición de aprendizajes y habilidades en los alumnos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron valoraciones volumétricas ácido-base de diferentes productos naturales, comerciales y alimenticios. Como valorante en todos los casos se utilizó ácido clorhídrico o hidróxido de sodio como patrón secundario, los cuales fueron estandarizados con carbonato de sodio y biftalato de potasio, respectivamente [3].

Se realizaron valoraciones para siete productos naturales y comerciales:

i) Crema comestible
ii) Vino tinto
iii) Ácido muriático
iv) Líquido para batería de auto
v) Jugo de limón
vi) Limpiador de cocina
vii) Limpiador de baño

Las valoraciones realizadas se consideraron a partir de técnicas de análisis reportadas en la literatura, así como en compendios oficiales [4-8]. En todos los casos se efectuó la técnica reportada en la literatura para que la determinación de la acidez o basicidad de ésta sirviera como referencia experimental. Para el escalado en la cantidad del analito se consideró el adecuado empleo de material de laboratorio, la conservación de las características fisicoquímicas y cuantitativas del proceso y la factibilidad en la adquisición de habilidades.

Con el propósito de ejemplificar los procedimientos realizados se describe la determinación de la acidez en vino (considerada a partir de ácido tartárico). En un matraz Erlenmyer de 25 mL se vertió el volumen de alícuota de vino y dos gotas de indicador azul de bromotimol. Esta disolución fue valorada con hidróxido de sodio estandarizado hasta el vire de coloración por el indicador. Las alícuotas se fueron disminuyendo hasta una cantidad tal que se pueda determinar convenientemente el punto estequiométrico.

La valoración para cada producto comercial se realizó al menos por triplicado. El porcentaje de acidez o basicidad se efectuó con base en el Principio de Equivalencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de porcentaje de acidez o basicidad determinados para cada producto analizado, es importante destacar que en todos los casos el escalamiento se efectuó hasta la mínima cantidad de muestra en la que fue posible la determinación visual (cambio de color del indicador) del punto estequiométrico con el propósito de realizar la determinación de acidez o basicidad de manera adecuada.

Tabla 1. Determinación de la acidez o basicidad en productos comerciales determinada por la técnica reportada en la literatura y modificada con disminución de volumen de alícuota.

Producto comercial	**Masa o volumen de muestra (g o mL)**	**% de acidez o basicidad**	**% de acidez o basicidad reportada**
Crema comestible[1]	Técnica reportada 10.2646 5.1231 2.6996 1.3806	0.5795 0.5640 0.5650 0.5584 0.5678	No Menor al 0.5%
Vino Tinto [1]	Técnica reportada 5 3 2	5.2666 5.2187 5.2666 5.2666	4.-5.5 g/L
Ácido Muriático[1]	Técnica reportada 5 3	12.4027 12.5048 12.7600	12.5%
Líquido para batería de auto[1]	Producto directo 5 3 2 1	37.3268 37.5143 37.6301 37.3407 38.2090	36%
Jugo de limón[1]	Técnica reportada 5 3	6.5780 6.5372 6.5826	6% depende de la maduración del fruto
Limpiador de baño[2]	Producto directo 5 3	1.9540 1.9157 1.9157	2.02%
Limpiador de cocina	Técnica reportada 10 5 3 1	0.5596 0.5628 0.5628 0.5628 0.5628	0.5%
Pato limpiador de baño[2]	Producto directo 5 3	1.9540 1.9157 1.9157	2.02%

[1]Disolución de estándar secundario de $NaOH_{ac}$ fue empleada como valorante.
[2]Disolución de estándar secundario de HCl_{ac} fue empleada como valorante

Los resultados muestran que al realizar las valoraciones por la técnica reportada y por aquellas en las que se disminuyó la cantidad se obtienen porcentajes de acidez o basicidad similares. Lo que permite establecer que las técnicas se pueden considerar como equivalentes y que resultan viables para la cuantificación ácido-base.

Los beneficios que genera la realización de estas experimentaciones es un aprendizaje significativo en el alumno ya que vincula el tema ácido-base con cuestiones y aplicaciones propias de su área o bien de la vida cotidiana, conlleva a una disminución significativa en el gasto de reactivos y por ende en la generación de residuos, teniendo así un menor impacto medio ambiental, propicia un conocimiento y manejo adecuado del material y equipo de laboratorio (indispensable en su formación profesional) y apoya a la comprensión del equilibrio químico ácido - base, por medio de la vinculación de los modelos químico-matemáticos que explican el comportamiento de las valoraciones con lo que observa en la experimentación. Coadyuvando de esta manera al desarrollo de alumnos de licenciatura con una formación química adecuada y consientes con el cuidado del medio ambiente, además de conducir a que las experiencias prácticas que se llevan a cabo en la Universidad sean tendientes a una química verde. Hacia el entorno industrial la modificación de las técnicas con el empleo de cantidades menores conlleva no sólo a los impactos antes referidos, sino también a una optimización de recursos y con ello a impactos favorables en lo económico.

CONCLUSIONES

Se implementaron favorablemente valoraciones ácido-base con la disminución de cantidad de muestra de productos comerciales con la finalidad de determinar la acidez o basicidad, con resultados equivalentes a los obtenidos mediante las técnicas convencionales reportadas en la literatura, esto conlleva a un menor empleo de reactivos y una disminución en la generación de residuos y por tanto un menor impacto al medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el apoyo otorgado por el programa *PAPIME PE201818*

REFERENCIAS

[1] D. Harris. *Análisis Químico Cuantitativo*, 3ª ed. España: Reverté, 2012.
[2] F. Aguilar. Tesis: material didáctico de apoyo para las materias de Análisis I de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo y Química Analítica Básica para las licenciaturas de Bioquímica Diagnóstica y de Farmacia. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), México. 2015
[3] F. Orozco. *Análisis Químico Cuantitativo*, 8ª ed. México: Grupo Editorial Porrúa, 1979.
[4] W. Horwitz. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17 ed., AOAC International, USA. 2000
[5] Secretaria de Salud. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 11 ed., Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014
[6] T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York. 1998
[7] J. Guiteras, *Curso Experimental de Química Analítica*. México: Síntesis. 2003
[8] R. Giraldo, *Manual de Técnicas de Laboratorio Químico*. Colombia: Universidad de Antioquia. 2009

DESARROLLO DE ELECTRODOS DE PELÍCULA DE OXIDO SOBRE ACERO INOXIDABLE (POSAI) COMO ALTERNATIVA PARA VALORACIONES ÁCIDO-BASE.

*Botello-Pozos, J.C., Pérez-Saavedra, J.J., Macías-Hernández, C., y Montiel-Franco, R.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), Av. 1º de Mayo s/n, Sta. María Las Torres, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54740 Estado de México, México.

*Autor para correspondencia: jbotello@comunidad.unam.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

La potenciometría es una de las técnicas instrumentales de análisis más empleadas para el seguimiento de valoraciones que involucran equilibrios ácido-base tanto en el entorno académico de nivel licenciatura como a nivel industrial, sin embargo los costos de los potenciometros y de los electrodos dificulta en ocasiones que se pueda contar con el equipamiento necesario: En este trabajo se propone una alternativa para realizar la medición de dichas valoraciones, mediante el empleo de electrodos de película de óxido sobre acero inoxidable (POSAI). Se presenta el diseño, construcción y ensayo de un electrodo combinado constituido por dos electrodos de POSAI, que forman un sistema Fe°/FeO, en el que se tiene una relación lineal del E en función de pH, de manera que, al mantener el pH constante en uno de los electrodos, el potencial de este no se modifica y puede ser utilizado como electrodo de referencia, el segundo electrodo estará en contacto con la solución y funciona como electrodo indicador. El electrodo combinado diseñado se utiliza para realizar valoraciones potenciométricas ácido base (ácido nítrico con hidróxido de sodio, en diferentes concentraciones: 0.01, 0.001 y 0.005 M). A los resultados obtenidos se les realizó la "prueba estadística t de Student", con lo que se determina que no existe diferencia significativa en relación a valoraciones llevadas a cabo con un electrodo convencional de vidrio.

Palabras clave: Acero, electrodo, pH; potenciometría; valoraciones.

INTRODUCCIÓN

La potenciometría es una de las técnicas instrumentales de análisis más empleada, con ella es posible seguir valoraciones oxido-reducción, de halogenuros y ácido-base [1], estas últimas de manera común se incluyen en diversos cursos de química a nivel licenciatura. Sin embargo, para las instituciones de educación superior no siempre es fácil contar con un equipamiento adecuado y aunado esto a los costos cada vez más elevados de los electrodos dificulta el poder atender la amplia demanda que se suele tener.

Por otro lado, en muchos compendios de técnicas de análisis se suelen proponer valoraciones con volúmenes de al menos 25 mL lo que implica un gasto en reactivos y la generación de cantidades considerables de residuos [2].

Lo anterior establece los antecedentes para que se busquen técnicas alternativas de bajo costo, y que permitan tener una disminución de residuos.

En este trabajo se presenta la metodología para oxidar dos alambres de acero especial 316 con una mezcla de trióxido de cromo en ácido sulfúrico [3, 4], a los alambres sometidos a la oxidación (película de óxido sobre acero inoxidable, POSAI), se les determina experimentalmente la pendiente y correlación, si esta última es de al menos 0.99 son utilizados como electrodos para la experimentación [5].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron electrodos POSAI., para ello alambres de acero 316 se sumergieron en una disolución de trióxido de cromo en ácido sulfúrico a una temperatura constante, generando así una película de óxido sobre acero 316.

Con la finalidad de probar el funcionamiento de los electrodos se realizaron valoraciones potenciométricas de ácido nítrico y de hidróxido de sodio (ambos empleados como analito y valorante). Para ello se utilizaron tres niveles de concentración, considerando alícuotas de valoración menores o iguales a 10 mL empleando para el monitoreo del potencial electrodos POSAI (tanto como electrodo indicador, como electrodo de referencia) así como un electrodo convencional de vidrio simultáneamente con el propósito de comparar las respuestas [6]. Todos los reactivos empleados fueron grado analítico.

Se realizó el análisis y comparación de las valoraciones mediante el gráfico E=f(V) y se determinó en todos los casos el punto de equivalencia mediante la primera derivada del potencial con respecto al volumen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los electrodos POSAI (Película de Óxido Sobre Acero Inoxidable) pueden ser sensibles a la concentración de protones en disolución (H^+), por este motivo es posible emplearlos en las titulaciones potenciométricas tanto como electrodo indicador, así como de referencia (mantenido en una solución la concentración de (H+), de esta manera el potencial será constante). Esto debido a que se forma un sistema Fe°/FeO, cuyo equilibrio electroquímico es:

$2H^+ + FeO + 2\,e^- \leftrightarrow Fe^\circ + H_2O$

Aplicando a este equilibrio el modelo de la ley de Nernst se obtiene:

$E = E^\circ + 0.0592 / 2 \log [H +]^2$

$E = E^\circ - 0.0592\ pH.$

Como puede observarse el potencial a registrar depende solamente del pH del sistema. Al realizar las valoraciones se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con electrodos convencionales de pH (electrodos de vidrio), como puede observarse en las figuras 1 y 2 se obtienen curvas bien definidas con el comportamiento "típico" para sistemas ácido-base, lo que permite una adecuada determinación del punto de equivalencia para así poder realizar la cuantificación de analitos de interés.

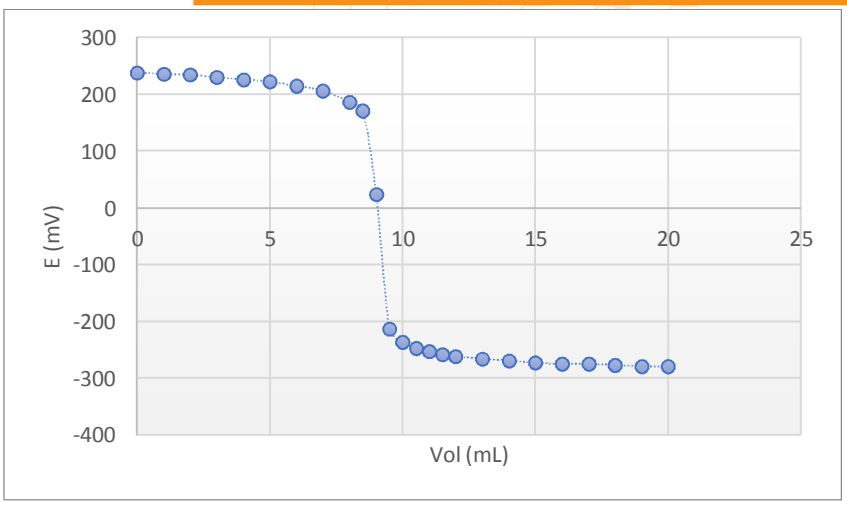


Figura 1. Valoración de NaOH 0.1 M, empleando HNO_3 como valorante, seguida con electrodo POSAI

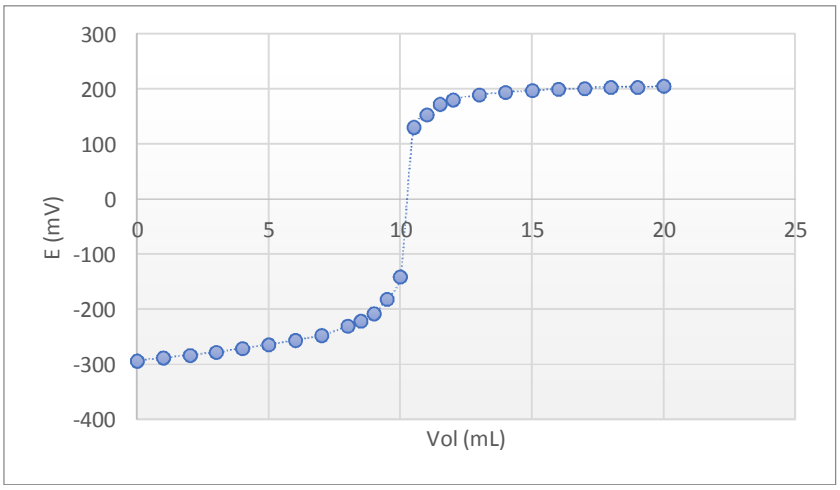


Figura 2. Valoración de HNO3 0.1 M, empleando NaOH como valorante y seguida con electrodo POSAI

Las valoraciones se efectuaron al menos por triplicado y en todos los casos se comparó el punto de equivalencia obtenido con las curvas seguidas con electrodos POSAI con aquellas monitoreadas con electrodos convencionales, realizando la prueba estadística de t de student determinando que no existe diferencia significativa en los valores obtenidos, por tanto, las curvas de valoración son equivalentes y permiten la cuantificación adecuada de analitos de interés con características ácido-base.
El empleo de estos electrodos permite disminuir sustancialmente el gasto de reactivos y por tanto la generación de residuos, por lo que representan una opción en la realización de determinaciones químicas más amigables con el medio ambiente.

CONCLUSIONES

Se implementaron electrodos POSAI para realizar el seguimiento de valoraciones ácido-base en sustitución de electrodos de vidrio (tradicionales como electrodos indicadores de pH). El

comportamiento de la curva de valoración y la determinación del punto de equivalencia son similares en valoraciones de hasta 0.001M.

El empleo de estos electrodos alternativos permite realizar valoraciones de volúmenes iguales o menores a 10mL con lo que se tiene una disminución sustancial en el gasto de reactivos, así como en la generación de residuos en comparación a lo que se tiene al realizar técnicas tradicionales de volumetría (volúmenes mayores o iguales a 25 y 50 mL).

Se establece que estos electrodos pueden ser una adecuada alternativa para el seguimiento de valoraciones ácido-base en el ámbito de la docencia e incluso factibles de ser empleados en investigación y en el entorno industrial con una disminución en gastos de alrededor de 100 veces respecto a los electrodos tradicionales.

AGRADECIMIENTOS
El presente trabajo se realizó con el apoyo otorgado por el programa:
PAPIME PE201818

REFERENCIAS

[1] D. Harris. *Análisis Químico Cuantitativo*, 3ª ed. España: Reverté, 2012.
[2] F. Orozco. *Análisis Químico Cuantitativo*, 8ª ed. México: Grupo Editorial Porrúa, 1979.
[3] J. de J. Pérez, S. Rincón, M. Tenorio. "Construcción de un Electrodo combinado Posai-Posai Para Microvaloraciones Ácido-base". *Tec. en Marcha*. 26(4): 3-12. 2013.
[4] J. de J. Pérez, S. Rincón, C. Hernández, C. Romero. "Potenciometría de oxidorreducción a microescala en docencia". *Tec. en Marcha*. 24(2): 45-52. 2011.
[5] M. Swartz, *Analytical method, development and validation*. Marcel Dekker INC USA, pp. 53-67, 1997
[6] J. de J. Pérez, S. Rincón. "Potenciometría Con Volúmenes a Nivel de Microescala en Educación". *Rev. De Edu. Quím*. 14(3): 148-150. 200

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO A MICRO, SEMI-MICRO Y MACRO ESCALA PARA TITULACIÓN ACIDO BASE.

*Cáñez-Carrasco, M.G., García-Alegría, A.M., y Orduño-Fragoza, O.

Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Luis Encinas y Rosales S/N, Colonia Centro, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

*Autor para correspondencia: guadalupe.canez@unison.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

Se validó el método volumétrico a microescala, semi-microescala y macroescala en una titulación ácido-base, con la finalidad de ilustrar de manera sencilla la metodología para la estimación de los parámetros analíticos, que son necesarios para darle mayor confiabilidad a los resultados. Para ello se evaluó la exactitud mediante el porcentaje de recuperación, precisión con el porcentaje del coeficiente de variación, linealidad (gráfica/visual) y mediante el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R^2), sensibilidad con el cálculo de la pendiente (m), repetibilidad con análisis de varianza. Los resultados obtenidos para la exactitud de los métodos fue: 100.08, 100.14 y 100.00% de recuperación, respectivamente; precisión <1.81% de coeficiente de variación; linealidad 0.9992, 0.9975 y 0.9977 de coeficiente de correlación (R), respectivamente, en tanto que el valor obtenido para R^2 fue de 0.9955, 0.9949 y 0.9985, respectivamente; sensibilidad m = 5.13±0.08, 31.90±0.07 y 32.19±4.53 molesL^{-1}, respectivamente. La validación de la precisión a través de la repetibilidad de los procedimientos de medida también es un requisito de las normas internacionales que se utilizan para implantar un sistema de gestión de la calidad en los laboratorios clínicos, por lo que a partir de los resultados obtenidos la repetibilidad se considera aceptable para los métodos a microescala y macroescala. Para confirmar la validación del método analítico se evaluó su aplicabilidad cuantificando la concentración de CH_3COOH en vinagre comercial por el método a macroescla (2.322 ± 0.013 M) y a microescla (2.444 ± 0.065 M).

Palabras clave: Validación; Método analítico; titulación; microescala.

INTRODUCCIÓN

Los asuntos ecológicos cada día adquieren mayor relevancia. En la actualidad son parte de los modelos educativos en nuestro país por lo que las universidades cada vez los tratan con mayor énfasis debido a que son generadoras, en menor escala, de desechos y residuos peligrosos que incrementan el problema de la contaminación ambiental. En aquellas universidades donde se enseñan profesiones relacionadas con el área Química, el problema de la contaminación ambiental se ve incrementado. Para solventarse, se han probado diversas estrategias que van desde el reciclaje de los componentes de los desechos, tratamiento de los mismos, hasta la sustitución por reactivos menos peligrosos [1].

Recientemente se ha desarrollado una nueva estrategia para salvar el problema anterior. Esta estrategia consiste en reducir los niveles de experimentación a valores de 1 g para sólidos y 2 mL para líquidos

como máximo (más exactamente, de 25 a 150 mg para sólidos y 100 a 2000 µL para líquidos). A esta estrategia se le ha denominado experimentación a nivel microescala. Las técnicas a nivel microescala cada día adquieren mayor relevancia en la enseñanza experimental de la Química, debido a que favorecen aspectos de seguridad e higiene, son económicas, ecológicas y sobre todo didácticas. Se tiene conocimiento de que la experimentación a nivel de microescala se aplica en países como Estados Unidos, Alemania, Finlandia, Rusia, Egipto y, por supuesto, México [2].

El trabajo experimental contribuye a que al estudiante ponga en cuestión sus hipótesis y predicciones que emergen de sus conocimientos, tanto empíricos como teóricos, relacionados con el evento. Cuando se cuenta con los instrumentos y sustancias necesarias para la realización de diversas prácticas de laboratorio o, en su caso, situaciones experimentales, es posible promover en los estudiantes la realización de diversas tareas propias del trabajo científico, tales como: formular interrogantes para que sean investigadas; elaborar hipótesis para que las sometan a comprobación; predecir resultados experimentales; trabajar de acuerdo con sus propios diseños; formular nuevas cuestiones (preguntas) basadas sobre su propia investigación o aplicar una técnica experimental adquirida en la investigación [3].

El reconocimiento al valor del trabajo experimental en las clases de ciencias ha llevado a un movimiento mundial basado en el diseño de experimentos de microescala y los correspondientes materiales de laboratorio fabricados a escala con el propósito de que un número cada vez más amplio de estudiantes accedan a esta importante actividad, ya que ofrece grandes ventajas sobre los experimentos desarrollados en escala normal. Actualmente, los estudiantes de cualquier ámbito, y en especial en la Educación Superior, deben tender a formarse en las diferentes disciplinas dentro del marco de un aprendizaje integral que contemple amplios criterios de responsabilidad ética, cívica y medioambiental. Desde esta perspectiva, el profesorado debe comprometerse a ofrecer los recursos necesarios y la información adecuada para una plena concientización del estudiante en temas de materia medioambiental para un desarrollo sustentable. La realización del trabajo experimental a microescala puede contribuir a lo mencionado anteriormente, adaptando prácticas convencionales para su realización a microescala. Esta adaptación, además de cumplir con los fines formativos ya mencionados, disminuye los costos económicos asociados tanto al consumo de reactivos como a la generación de residuos [4].

Existe normatividad internacional y nacional en donde se proponen pautas a seguir para lograr un efectivo sistema de control de mediciones; sin embargo, lograr cubrir esas recomendaciones se dificulta, cuando se trata de un método de prueba. En este trabajo se validó el método volumétrico a microescala, semi-microescala y macroescala, con la finalidad de ilustrar de manera sencilla la metodología para la estimación de los parámetros analíticos, que son necesarios para darle mayor confiabilidad a los resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Descripción del Método

La medición de ácido acético en una muestra problema, se basó en la titulación de esta con una disolución de hidróxido de sodio utilizando como indicador fenolftaleína.

$$CH_3COOH + NaOH \rightarrow CH_3COONa + H_2O$$

b) Modelo Matemático

En esta etapa se modeló el proceso de medida. Es decir, se estableció la relación que existe entre el resultado analítico y los parámetros de los que depende.

$$N_{CH_3COOH} = \frac{N_{NaOH} * V_{NaOH}}{V_{CH_3COOH}} = \frac{m_{KHP} * P_{KHP} * V_{NaOH}}{Meq_{KHP} * V_{NaOH_{KHP}} * V_{CH_3COOH}} \quad (1)$$

Donde N_{NaOH} representa la normalidad de la disolución titulante de hidróxido sódico, V_{NaOH} el volumen gastado de disolución NaOH y V_{CH_3COOH} el volumen de muestra (ácido acético) titulada. En la ecuación 1 se asume que el hidróxido sódico se estandariza frente a una disolución de biftalato de potasio (KHP) como patrón primario. Por tanto, N_{NaOH} depende a su vez de la masa de KHP (m_{KHP}), de su pureza (p_{KHP}), de su masa equivalente (meq_{KHP}), y del volumen de la disolución de NaOH gastado durante la valoración del KHP ($V_{NaOHKHP}$).

Para la validación de la metodología analítica se evaluaron los siguientes parámetros: exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad y repetibilidad, de acuerdo a lo que establece el Centro Nacional de Metrología y la Entidad Mexicana de Acreditación [5].

c) Parámetros Analíticos de Calidad para la Validación de cada Método

Exactitud

Se utilizaron estándares de trabajo preparados a partir de una disolución madre.

El cálculo del porcentaje de recuperación se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración real}} \times 100 \quad (2)$$

En validación, el porcentaje de recuperación aceptable está entre 85 y el 115 % [6,7].

Precisión

La precisión se evaluó mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variación (% CV).

$$\% \text{ CV} = \frac{S}{\bar{x}} * 100 \quad (3)$$

Donde;

$\bar{x}$ = media del grupo muestral

S = desviación estándar

En validación, el % CV aceptable es < 2 % [6,7].

Linealidad

La linealidad de la curva de calibración se determinó utilizando cinco concentraciones diferentes del estándar medio con cinco repeticiones cada una [7,9,10], obteniéndose 25 lecturas. Este parámetro se evaluó por inspección visual del gráfico señal contra la concentración del analito y por dos métodos estadísticos apropiados: coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (R). Estas determinaciones de linealidad no son excluyentes unas de otras [8, 11].

Coeficiente de Determinación

$$R^2 = 1 - \frac{\sum\left(Y - \hat{Y}\right)^2}{\sum\left(Y - \bar{Y}\right)^2}$$

(4)

Donde:

$$\hat{Y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

Coeficiente de Correlación de Pearson

$$R = \frac{\left[a\sum y + b\sum xy - n(\hat{Y})^2\right]}{\sum y^2 - n\hat{Y}^2} \quad (5)$$

Donde:

$\hat{Y} = \frac{\Sigma y}{n}$

El criterio de aceptación es si R y/o $R^2 > 0.995$, entonces el método es lineal [7].

Sensibilidad

La sensibilidad de un método mide su capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito o mensurando. Según la IUPAC [7], la sensibilidad (m) se define como el cociente entre la señal medida (absorbancia, s) y la concentración (c) de analito:

$$m = s/c \quad (6)$$

En una regresión lineal, la sensibilidad es la pendiente de la curva a una concentración dada. En caso de ser una recta, coincide con la pendiente de la misma. Como valor se puede utilizar el promedio de las pendientes obtenidas en las rectas de los ensayos de estandarización, indicando su desviación estándar [9].

Repetibilidad

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de un mismo mensurando, llevadas a cabo totalmente bajo las mismas condiciones de medición [8]. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento, analista/observador, ubicación, instrumento y condiciones de medición. Por mediciones sucesivas se entiende aquellas mediciones repetidas dentro de un corto período de tiempo. Se evaluó mediante análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$).

Aplicabilidad del método analítico

Una vez que se realizó la validación del método analítico se procedió a comprobar la aplicabilidad del mismo mediante la cuantificación de la concentración de ácido acético en una muestra de vinagre comercial, con el método a macro y microescala.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para cada uno de los métodos se establecieron las concentraciones adecuadas de los estándares para la elaboración de las curvas de calibración. Una vez establecido el intervalo de trabajo para las concentraciones dentro del rango de linealidad, se seleccionaron cinco concentraciones para obtener curvas de calibración por triplicado.

Se estimaron los siguientes parámetros analíticos de calidad para la validación de los métodos a microescala, semi-microescala y macroescala [12].

Exactitud

Uno de los criterios de calidad que tiene gran relevancia en la estandarización y validación de un método analítico es la exactitud, ya que este parámetro refleja de manera evidente, el grado de concordancia entre un valor real (medido) y un valor teórico (verdadero) y generalmente se sustenta a través del porcentaje de recuperación o recobro [6]. Los valores obtenidos para la exactitud de los métodos por medio del porcentaje de recuperación, calculados a partir de la ecuación (2), para los estándares 0.12, 0.16, 0.20. 0.24 y 0.28 molesL^{-1} se muestran en la Tablas 1, 2 y 3. Como se puede apreciar, los valores para el método a microescala fueron: 98.00, 101.68, 101.69, 98.88 y 100.14 %; para el método semi-microescala: 98.17, 101.00, 99.45, 103.83 y 98.25 % y a macroescala: 98.50, 100.12, 100.00, 102.75 y 98.64 %. El porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rango 100 ± 15 % considerado como aceptable [6,7], ya que los valores fluctuaron entre 98.00 y 103.83 %, con un promedio global de 99.12 % de recuperación. Si se considera el promedio global de 99.12 % de recuperación como valor aceptable de la exactitud, se tendría otro rango más estrecho para avalar la exactitud del método de acuerdo a nuevos criterios establecidos recientemente por la EMA [6], en donde se establece un rango de aceptabilidad de 100 ± 2 % de recuperación.

Tabla 1. Resultados obtenidos a partir de cinco concentraciones de CH_3COOH por quintuplicado a microescala.

	Concentración de CH_3COOH (moles L^{-1})				
	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28
Promedio±DE**	0.1173±0.000	0.1632±0.0102	0.2025±0.0102	0.2370±0.0040	0.2813±0.0051
% Recuperación	98.00	101.68	101.69	98.88	100.14
% CV	0.00	6.23	5.02	1.70	1.81
Sensibilidad (m)	31.67	32.08	31.50	30.00	27.86

El promedio corresponde a cinco réplicas de la concentración del analito, con un total de 25 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Tabla 2. Resultados obtenidos a partir de cinco concentraciones de CH_3COOH por quintuplicado a semi-microescala.

	Concentración de CH_3COOH (moles L^{-1})				
	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28
Promedio±DE**	0.1178±0.000	0.1616±0.0000	0.1986±0.0000	0.2470±0.0019	0.2751±0.0018
%Recuperación	98.17	101.00	99.45	103.83	98.25
% CV	0.00	0.00	0.00	0.79	0.65
Sensibilidad (m)	32.50	32.50	31.50	32.22	30.60

El promedio corresponde a cinco réplicas de la concentración del analito, con un total de 25 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Tabla 3. Resultados obtenidos a partir de cinco concentraciones de CH_3COOH por quintuplicado a macroescala.

	Concentración de CH_3COOH (moles L^{-1})				
	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28
Promedio±DE**	0.1182±0.000	0.1602±0.0020	0.2000±0.0000	0.2466±0.0020	0.2761±0.0021
%Recuperación	98.50	100.12	100.00	102.75	98.64
% CV	0.00	1.23	0.00	0.80	0.76
Sensibilidad (m)	31.67	32.08	31.50	30.00	27.86

El promedio corresponde a cinco réplicas de la concentración del analito, con un total de 25 muestras.

(**) = Desviación Estándar.

Precisión

La precisión es una medida de la dispersión de los datos en torno a un valor central o el grado de concordancia entre mediciones replicadas de la misma cantidad, y puede expresarse como rango, desviación estándar, porcentaje del coeficiente de variación (% CV) o la varianza. En este estudio, la precisión se evaluó mediante el % CV (ecuación 3), tal y como se aprecia en las Tablas 1, 2 y 3, los resultados para este parámetro no rebasan el valor de 1.81 %, por lo cual, la precisión para estos métodos analíticos se considera aceptable, ya que para métodos instrumentales debe ser menor del 2 % [7,9]. A excepción de dos estándares 0.16 y 0.20 moles L^{-1}, del método a microescala que fueron de 6.23 y 5.02 %, respectivamente.

Linealidad

La linealidad es la capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen [6]. En este estudio, la linealidad se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), ecuación 5 y el coeficiente de correlación de Pearson (R), ecuación 6. Donde, R indica el grado de asociación entre dos variables (en este caso volumen y concentración) y R^2, indica qué tan bueno es el modelo de regresión utilizado. Los criterios de aceptación para ambos parámetros son que R y R^2 deben ser mayores que 0.995 [5]. La inspección visual de las Figuras 1, 2 y 3 indican que la linealidad es aceptable, en tanto que el valor obtenido para R^2 fue de 0.9985, 0.9949 y 0.9955, respectivamente. Por lo que de acuerdo a la EMA [16], los valores obtenidos son igual o mayores que 0.995 y por lo tanto se corrobora que la linealidad obtenida es aceptable.

Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico, se define como la pendiente, m, de la curva de calibración, ya que esta define la razón de cambio de la propiedad medida por unidad de concentración [9]. Una respuesta no lineal en la gráfica de volumen vs concentración indica un cambio en el valor de la sensibilidad en función de la concentración.

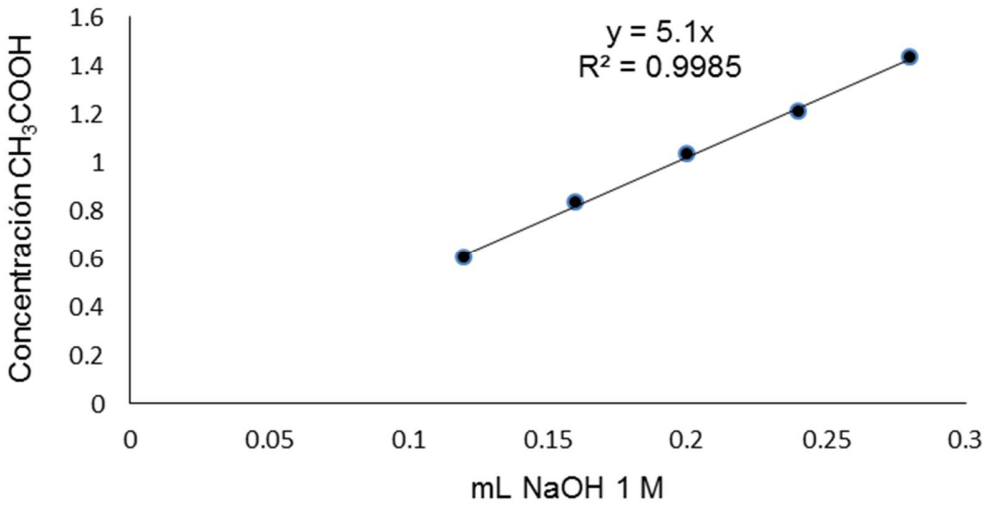


Figura1. Curva de calibración para cuantificación de CH_3COOH a microescala.

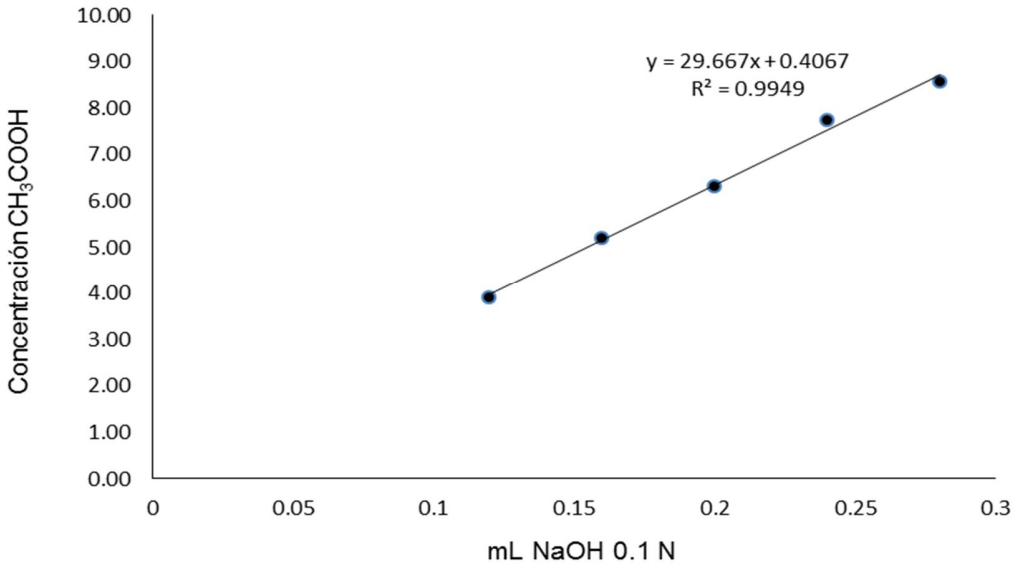


Figura 2. Curva de calibración para cuantificación de CH_3COOH a semi-microescala.

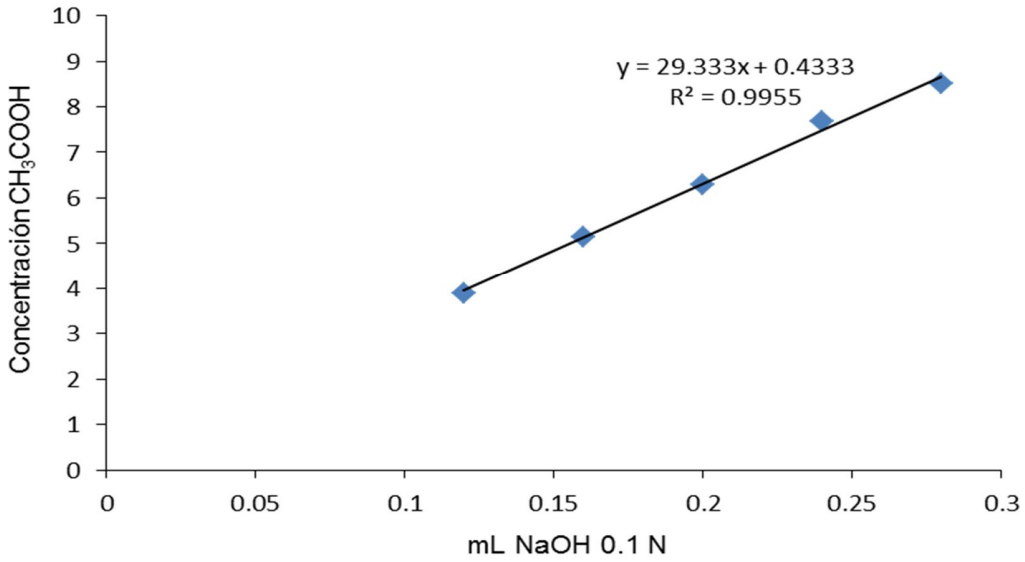


Figura 3. Curva de calibración para cuantificación de CH_3COOH a macroescala.

La sensibilidad aunque es independiente de la concentración, se obtiene como el cociente de dividir la señal medida (volumen) entre su valor (m = s/c), y por lo que se puede observar es simplemente igual a la pendiente promedio. En las Tablas 1, 2 y 3 se correlacionan los datos mencionados y se muestra el valor de la m (sensibilidad) para los métodos microescala, semi-microescala y macroescala, respectivamente. El valor de sensibilidad obtenido a partir de la ecuación 4 debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración en base a la lectura. Mientras más próxima al eje de las Y esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas.

Por el contrario, entre más se aleje al eje de la Y, grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura. Se considera, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta frente a una determinada cantidad de analito [14].

Repetibilidad

Por otro lado, la repetición es esencial para obtener estimaciones fiables de características de desempeño del método, tales como la precisión y el sesgo. Los experimentos que implican análisis repetidos deben ser diseñados para tener en cuenta todas las variaciones en las condiciones operativas que se pueden esperar durante el uso rutinario del método [12]. Por esto, la repetibilidad, supone dar la más pequeña variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo. En relación a los resultados obtenidos de repetibilidad para las concentraciones utilizadas, se puede observar que el método es aceptable para las tres concentraciones utilizadas, de acuerdo al análisis la prueba de Friedman (no paramétrica) nos permite determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre más de dos grupos con mediciones pareadas. Lo anterior indica que la Repetibilidad obtenida en el análisis por parte del analista en el tiempo establecido que fue de 1 semana (Tabla 4), fue

aceptable para el método de microescala y no aceptable para el método semi-microescala en las tres concentraciones usadas (0.16M, 0.20M y 0.24M). Respecto al método macroescala no fue aceptable en la concentración 0.16 M (Tabla 4); sin embargo es importante considerar que para este método, en el análisis realizado el día 12 de noviembre de 2015 se obtuvieron datos muy diferentes a los otros días; quizá esto haya ocasionado que en esa concentración el método a macroescala no sea repetible.

CONCLUSIONES

Se validó el método volumétrico a microescala, semi-microescala y macroescala, para la titulación de ácido acético (CH_3COOH) con una disolución de NaOH 0.1 N, mediante los parámetros analíticos de exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad y repetibilidad. Los resultados obtenidos son aceptables de acuerdo a la normatividad nacional e internacional. También se corroboró la aplicabilidad de los métodos con una muestra de vinagre comercial.

Tabla 4. Análisis de precisión bajo condiciones de repetibilidad

[CH_3COOH]	p	Decisión
Método Microescala		
O.16 M*	0.186	Repetible
0.20 M*	0.238	Repetible
0.24 M*	0.090	Repetible
Método Semi-microescala		
O.16 M*	0.001	No Repetible
0.20 M*	0.001	No Repetible
0.24 M*	0.002	No Repetible
Método Macroescala		
O.16 M*	0.005	No Repetible
0.20 M*	0.115	Repetible
0.24 M*	0.750	Repetible

* Seis réplicas por día por cinco días. α = 5%. n = 30.

REFERENCIAS

[1] P. Castro, P. Nerlis, O. Verbel, J. Tadeo, "Química verde: un nuevo reto", *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, vol. 21, no. 2, 2011.

[2] R. R. Lozano, "Sostenibilidad en educación superior*", III Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde. Desarrollo sustentable, salud y ambiente*, Cintermex 22-24 Abril, Monterrey, Nuevo León, México, 2015.

[3] R. A. Aponte, G. R. Aguilar, S. I. Austin, "Trabajos prácticos en microescala como estrategia didáctica en cursos de química de educación media", *Actualidades Investigativas en Educación*, vol. 13, no. 2, 2013.

[4] A. González, C. Urzúa, "Experimentos químicos de bajo costo: un aporte desde la microescala", *Eureka*, vol. 9, no. 3, 2012.

[5] Centro Nacional de Metrología-Entidad Mexicana de Acreditación, "Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplea la técnica de espectrofotometría de ultravioleta-visible", México, D.F. 2008a.

[6] International Union Pure Applied Chemistry, "Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, compendium of chemical terminology" – the Gold Book, 2014.

[7] Centro Nacional de Metrología-Entidad Mexicana de Acreditación, "Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico", México, D.F. 2008b.

[8] Norma Mexicana, "NMX-152-IMNC-2005", vocabulario en metrología en química, México, D.F. 2005.

[9] C. C. R. Sabido, R. J. G. Rosado, R. A. F. Castellanos, A. D. A. Betancur, G. L. A. Chel, E. O. M. Acereto, "Adaptación de un micrométodo espectrofotométrico para determinación de fósforo en hueso", *Rev. Latinoamer. Quím*, vol. 38, No. 2, pp. 113-122, 2010.

[10] G. D. Christian, "Química Analítica", Sexta edición. Ed McGraw Hill, pp. 65-113. México, D. F., 2009.

[11] J. C. Miller, J. C. Miller, "Estadística y Quimiometría para Química Analítica", 4ª Edición, Editorial Pearson Prentice Hall, pp. 1-271. Madrid, España, 2002.

[12] AOAC, Association of official analytical chemist. "Official methods of analysis", 15th Edition, Washington D.C., 1990.

[13] P. P. Morillas, "Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados", 1ª ed. Madrid, España, 2016.

[14] Guía Técnica No. 1, "Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos". Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago de Chile, 2010.

[15] R. Suárez, E. Arévalo, L. Linares, F. Ustáriz, G. Hernández, "Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario". *Avances en química*, vol. 4 no. 2, pp. 53- 62, 2009.

DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE IONES Cr^{3+} USANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON EL ÁCIDO 11-MERCAPTOUNDECILFOSFÓNICO EN MEDIO ACUOSO.

[1]García-Grajeda, B.A., [2]Águila, S.A., [1]Peinado-Guevara, H., [3]Ochoa-Terán, A., [1]Cruz-Enríquez, A., y [1]*Campos-Gaxiola, J.J.

1. Facultad de Ingeniería Mochis, Universidad Autónoma de Sinaloa, Fuente de Poseidón y Prol. A. Flores S/N, C.U. Los Mochis, Sinaloa C.P., 81223.
2. Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CNyN-UNAM), Grupo Bionanotecnología, Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B.C., C.P. 22800.
3. Centro de Graduados e Investigación, Instituto Tecnológico de Tijuana, Bulevar Alberto Limón Padilla S/N, Tijuana, B.C., 22500, México.

*Autor para correspondencia: gaxiolajose@uas.edu.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un sensor colorimétrico para la detección de iones Cr^{3+}, mediante la síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro (AuNPs) usando el ácido 11-mercaptoundecilfosfónico (AMF). Las AuNPs se prepararon mediante la reducción acuosa de $HAuCl_4 \bullet 3H_2O$, utilizando citrato, como agente reductor; posteriormente AuNPs fueron funcionalizadas con AMF. Se prepararon dispersiones coloidales de Cr^{3+} (0-50 µM) utilizando AuNPs-AMF a temperatura ambiente para la detección. La funcionalización de AuNPs con AMF, se evaluó empleando la técnica de espectroscopia de IR, determinando la formación del enlace Au-S, indicando que AMF se coordina a la superficie de AuNPs. La banda de absorción característica de AuNPs se midió mediante la técnica de UV-vis; la absorción máxima se localizó a 530 nm. La detección colorimétrica de Cr^{3+} se evaluó mediante UV-Vis y por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM). El gráfico de calibración fue lineal dentro del límite de detección hasta 50 µM. El límite de detección encontrado para Cr^{3+} fue 9.01 µM; detección que se lleva a cabo en un amplio intervalo de pH (pH 4-9).

Palabras clave: Nanopartículas de oro; detección colorimétrica; iones Cr^{3+}

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados se encuentran presentes naturalmente en la tierra en ciertas cantidades distribuidas adecuadamente(1). Sin embargo, cuando éstos son liberados en el medio ambiente como resultado de las actividades humanas, se convierten en altos contaminantes del aire, suelo y sistema acuático. La contaminación por metales ha crecido rápidamente debido a las actividades antropogénicas, como los procesos industriales, fabricación de pinturas, aleaciones, el excesivo uso de químicos, así como también por el desecho de aguas residuales (2)(3). El cromo es considerado uno de los metales más tóxicos, debido a que afecta las funciones enzimáticas y el sistema nervioso en la salud humana. Este elemento existe principalmente en estados de oxidación Cr^{3+} y Cr^{6+} en la naturaleza. El Cr^{3+} es un oligoelemento esencial para el cuerpo humano y animales, porque desempeña un papel muy importante en la tolerancia de la glucosa, sobre la regulación del azúcar y lípidos (4). Sin embargo,

cantidades en exceso de Cr^{3+} pueden ser altamente tóxicas; la exposición a largo plazo puede causar irritaciones en la piel, daño al hígado y tejidos nerviosos, así como mutaciones y daños a componentes celulares que pueden conducir al cáncer, ya que Cr^{3+} muestra una alta afinidad con el ADN y las proteínas (5). Es por esto, que es de gran importancia el desarrollo de nuevos métodos, como la fabricación de sensores colorimétricos, que sean económicos y fáciles de usar para detectar dichos iones metálicos en solución acuosa.

Recientemente, los métodos colorimétricos basados en nanopartículas de oro (AuNPs) han sido de particular interés, ya que las AuNPs, con un tamaño promedio de 1-100 nm, presentan propiedades físicas y ópticas muy particulares; como la dispersión Raman superficial mejorada (SERS) (6) y la resonancia de plasmón superficial (SPR) (7). Este último fenómeno esta principalmente relacionado con la forma, tamaño, relación área/volumen de superficie, la distancia interpartícula y con la constante dieléctrica (índice de refracción) del medio que rodea a la partícula; confiriéndole múltiples aplicaciones en dispositivos ópticos, biomédicos, sensores colorimétricos, entre otros(8).

Estos sensores colorimétricos, a base de nanopartículas de oro, utilizan el acoplamiento de plasmón interpartícula bajo la agregación inducida de AuNPs por el analito en estudio, conduciendo a un desplazamiento hacia el rojo en la banda de absorción SPR y provocando un cambio de color del rojo al azul en las dispersiones coloidales (9), el cual puede ser observado a simple vista. Otro aspecto importante del método colorimétrico es que no requiere de equipos de alto costo y los procesos de detección son muy simples (10). Por lo que su desarrollo a partir de AuNPs, resulta muy atractivo para evaluar la sensibilidad de analitos, como los iones metálicos.

Por lo que, en este trabajo se obtuvieron nanopartículas de oro sintetizadas y funcionalizadas con el ácido 11-mercaptoundecilfosfónico (AuNPs-AMF) con el objetivo de detectar iones Cr^{3+}. Las nanopartículas de oro fueron preparadas mediante la reducción acuosa de $HAuCl_4$ utilizando citrato de sodio, como agente reductor. El ácido 11-mercaptoundecilfosfónico fue adherido a la superficie de AuNPs usando el grupo tiol, a través del enlace Au-S. Posteriormente, AuNPs-AMF, se utilizaron para la detección de iones metálicos. Solamente los iones de Cr^{3+} causaron la agregación de AuNPs-AMF. Otros iones metálicos también fueron estudiados para su sensibilidad y selectividad como K^+, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Ag^+, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Al^{3+}, Pb^{2+}, Bi^{3+}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich. Ácido tetracloroaúrico trihidratado ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), citrato de sodio, ácido 11-mercaptoundecilfosfónico (AMF), alcohol polivinílico (PVA), NaOH, KNO_3, $Cr(NO_3)_3$, $Mn(NO_3)_2$, $Fe(NO_3)_3$, $Co(NO_3)_2$, $Ni(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $AgNO_3$, $Zn(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Al(NO_3)_3$, $Pb(NO_3)_2$, $Bi(NO_3)_3$, con purezas superiores al 95%.

Métodos

Síntesis y funcionalización de AuNPs. Las nanopartículas de oro fueron obtenidas mediante la reducción de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ empleando citrato de sodio (11).Se realizó la disolución acuosa de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (100 mg, 0.25 mmol) en 200 mL de agua agitando y calentando a 70 °C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó una solución de citrato trisódico (40 mM, 294 mg, 25 mL) manteniendo esta temperatura hasta observar un cambio de color amarillo pálido a un rojo vino en el coloide. Después la temperatura

fue incrementada hasta 95 °C agitando durante 20 minutos más. Se adicionó una solución acuosa del ácido 11-mercaptoundecilfosfónico (AMF) (81.7 mg, 0.30 mmol, 25 mL), que contenía un equivalente de NaOH (0.30 mmol, 12.2 mg), manteniendo esta temperatura durante 1 hora, obteniendo nanopartículas de oro funcionalizadas (AuNPs-AMF).

Interacción de AuNPs con el ión metálico. Se realizaron dispersiones coloidales tomando 1 mL de la solución de AuNPs-AMF, 1 mL de PVA 1%, y diferentes concentraciones del ion en estudio ($1x10^{-4}$ M, solución patrón). Dichas muestras fueron preparadas a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y Funcionalización de las nanopartículas de oro

El sistema coloidal obtenido de la síntesis y funcionalización fue color rojo intenso, tal como se esperaba de acuerdo al método de síntesis establecida en diferentes referencias consultadas (11)(12). Las nanopartículas de oro fueron caracterizadas empleando la técnica de espectroscopia de UV-vis. En la **Figura 1** se muestran los espectros de absorción de las AuNPs antes y después de ser modificadas con AMF. La banda superficial de plasmón muestra un pequeño desplazamiento de 527 nm a 530 nm(-3 nm), así como una pequeña disminución de la absorbancia, asociado con la unión de AMF a la superficie de AuNPs, confirmando su funcionalización (13)(14). Este desplazamiento hacia el rojo se atribuye al incremento del índice de refracción del medio que rodea a las nanopartículas (15).

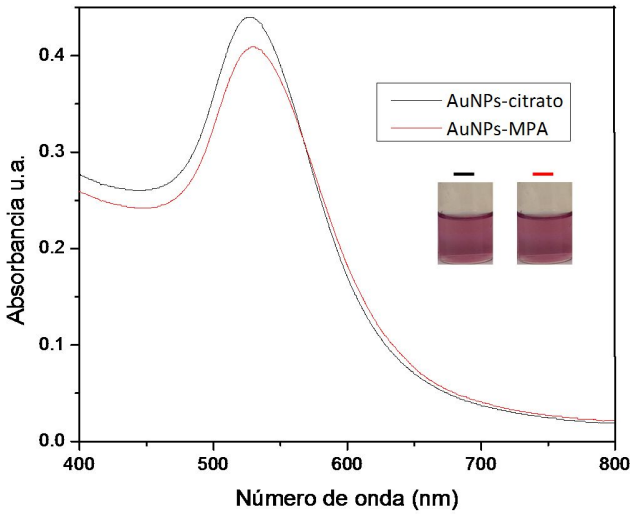


Figura 1. Espectros de UV-vis (-) Nanopartículas sintetizadas con citrato de sodio (-) AuNPs funcionalizadas con AMF.

Espectroscopia de IR. AuNPs-AMF fueron caracterizadas por IR. Las señales de vibración características de AMF son: 2920-2850 cm^{-1} (C-H_2), 2250-2400 cm^{-1} (S-H), 1225 cm^{-1} (P=O) and 950-930 cm^{-1} (P-OH) (16). Las bandas de vibración características de los grupos –SH estiramiento en el intervalo de 2400-2250 cm^{-1} correspondientes a AMF, desaparecen en el espectro de IR de AuNPs-AMF, sugiriendo que AMF se coordina con los átomos de oro sobre la superficie de AuNPs a través del enlace Au-S, llevándose a cabo la funcionalización del sistema AuNPs-AMF(13).

Microscopia electrónica de Transmisión. El diámetro de las AuNPs se determinó a través de las micrografías obtenidas por TEM. Donde se observó que el sistema AuNPs-AMF muestra una excelente dispersión en el medio que las rodea, con un intervalo de tamaño entre 14 y 30 nm, y un tamaño promedio de 20.8 nm.

Interacción de AuNPs-AMF con varios iones metálicos

La sensibilidad y selectividad de AuNPs-AMF se evaluó con diferentes iones metálicos, como, K^{+}, Cr^{3+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Al^{3+}, Pb^{2+} y Bi^{3+}, dicha evaluación fue monitoreada por espectroscopia de UV-vis y por colorimetría (detección por cambio de color observado visualmente). Se utilizaron concentraciones de 50 µmol/L en presencia de Cr^{3+} y 50 µmol/L de otros iones metálicos. La **Figura 2** muestra que bajo la interacción de otros iones metálicos, la longitud de onda de absorción máxima de AuNPs-AMF permanece a 530 nm, y solamente la presencia de Cr^{3+} provoca un cambio en el espectro; mostrando un desplazamiento en el pico de absorción de 530 nm a 595 nm. Este desplazamiento fue observado con un cambio de color rosa al azul, como resultado de la agregación de AuNPs-AMF inducida por Cr^{3+}.

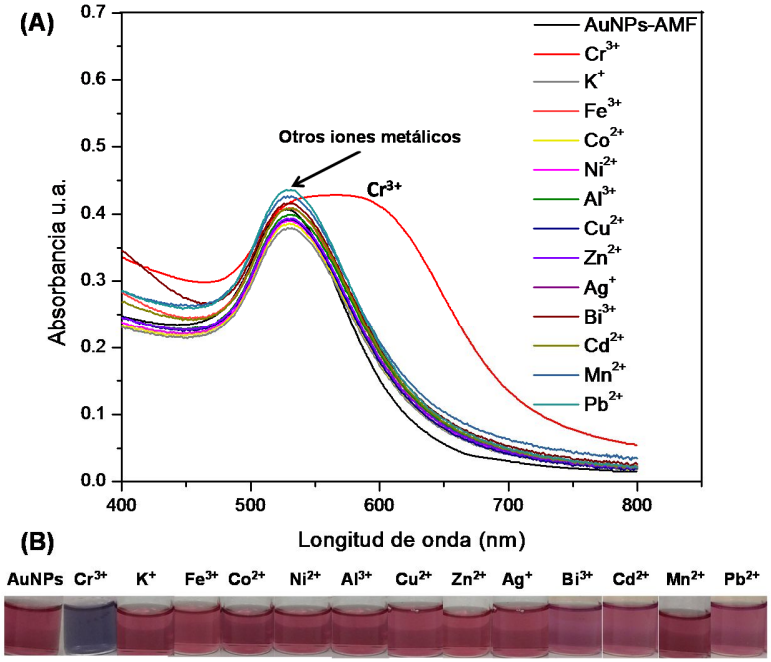


Figura 2. (a) Espectros de Uv-vis de AuNPs-AMF en presencia de diferentes iones metálicos (50 µmol/L Cr^{3+} y otros iones). (b) Imágenes de respuesta colorimétrica de AuNPs- AMF en presencia de varios iones metálicos.

Análisis de interferencia de Cr^{3+} con otros iones metálicos

El análisis de interferencia se realizó mediante la mezcla de Cr^{3+} con otros iones metálicos (50 µmol/L). Como se muestra en la **Figura 3** (barras azules), la relación de absorbancia (A_{595}/A_{530}) presenta un incremento drástico al añadir Cr^{3+}, mientras que otros iones metálicos muestran un cambio ligero, indicando una excelente selectividad por Cr^{3+}, comparado con los otros iones metálicos analizados; sugiriendo que únicamente Cr^{3+} induce la agregación de AuNPs-AMF. Por otra parte, se observa que la

relación A_{595}/A_{530} con la adición de Cr^{3+} y otro ion metálico (barras rojas) es similar al mostrado solamente con Cr^{3+}; infiriendo que otros iones metálicos no causan algún tipo de interferencia significativa que impida la interacción de Cr^{3+} con AuNPs-AMF, demostrando que el sistema es sensible y selectivo para Cr^{3+} en presencia de otros iones metálicos. Para confirmar la agregación de AuNPs-AMF por Cr^{3+}, se compararon las imágenes obtenidas por TEM, antes y después de añadir Cr^{3+}. Como se muestra en la **Figura 4**, AuNPs-AMF muestran una excelente dispersión en el medio en el que se encuentran, y bajo la adición de Cr^{3+} se presenta su agregación, como era esperado de acuerdo a los resultados discutidos previamente.

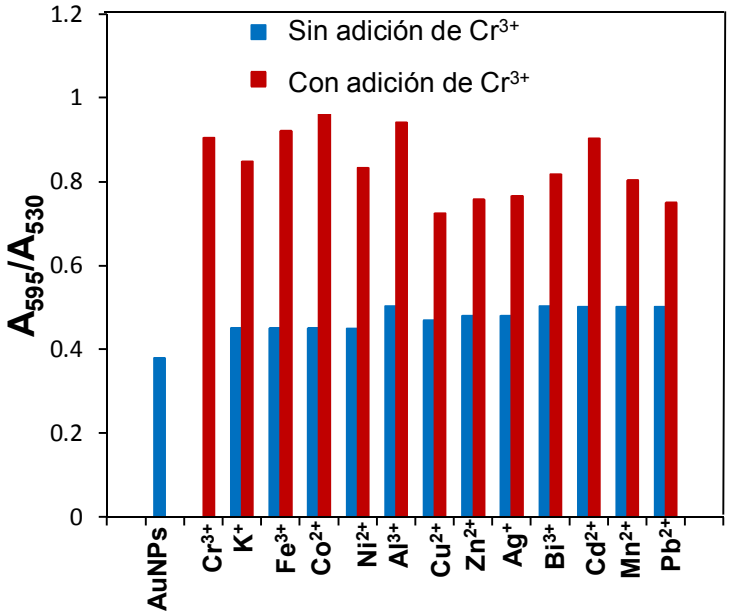


Figura 3. Barras azules, representan a relación de absorbancia (A_{595}/A_{530}) de la adición de un solo ion metálico (50 µmol/L de Cr^{3+} y de otros iones metálicos) a AuNPs-AMF; barras rojas, representan la relación de absorbancia (A_{595}/A_{530}) de la mezcla de Cr^{3+} con otro ion metálico (50 µmol/L) a AuNPs-AMF.

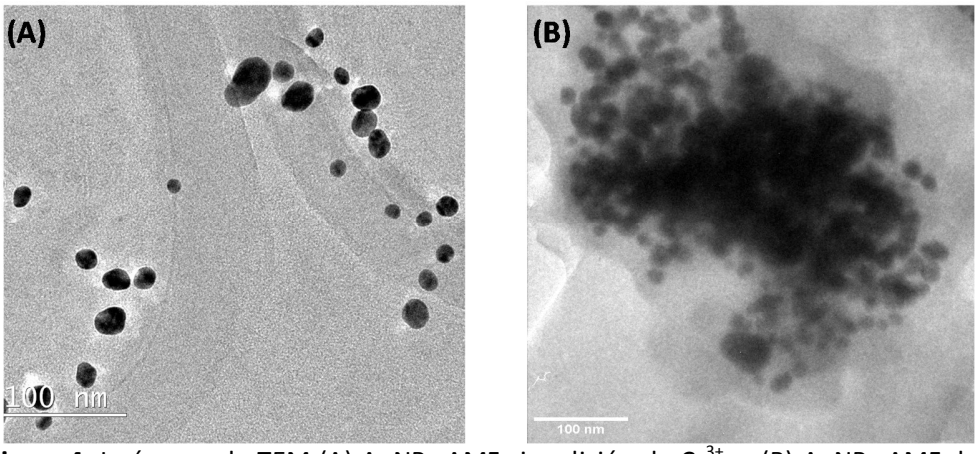


Figura 4. Imágenes de TEM (A) AuNPs-AMF sin adición de Cr^{3+}, y (B) AuNPs-AMF después de añadir 50 µmol/L de Cr^{3+}.

Mecanismo de interacción de AuNPs-AMF con Cr^{3+}

Para una mejor comprensión de la interacción entre AuNPs-AMF y Cr^{3+}, se empleó la técnica de espectroscopia de IR. Las bandas vibracionales para AuNPs-AMF se observaron a 3427 cm^{-1} que corresponde a grupos OH, a 2920-2850 cm^{-1} CH_2 de estiramiento, a 1160 cm^{-1} la vibración que corresponde al grupo fosfonato, a 1590 y 1402 cm^{-1} para los grupos carboxilatos del citrato. Así mismo, en el espectro de IR de AuNPs-AMF+Cr^{3+}, se observaron desplazamientos en los números de onda de las vibraciones más importantes, mencionadas anteriormente. Estos resultados son evidencia de la interacción de Cr^{3+} con las AuNPs-AMF y los iones del citrato en solución acuosa. Como se muestra en la **Figura 5**, la agregación de AuNPs-AMF en presencia de Cr^{3+}, es atribuida a los enlaces formados entre los grupos fosfonato y citrato con estos iones; a través de interacciones electrostáticas, produciendo un desplazamiento en la banda de plasmón a una longitud de onda mayor, y el cambio colorimétrico de rosa a azul, mencionado anteriormente.

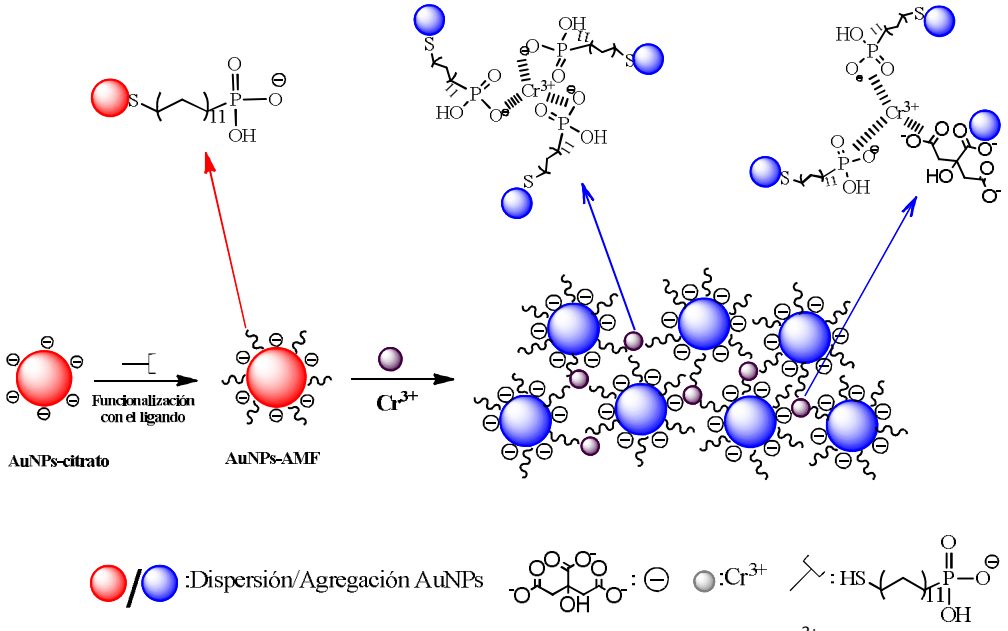


Figura 5. Descripción ilustrativa para la detección colorimétrica de Cr^{3+} a través del sistema AuNPs-AMF.

Respuesta de sensibilidad de AuNPs-AMF por Cr^{3+}

Para estudiar la sensibilidad (concentración mínima detectable de Cr^{3+}) y el intervalo lineal más a detalle, se utilizaron diferentes concentraciones de una solución estándar de Cr^{3+} en un intervalo de 0-50 µmol/L, y fue analizado por espectroscopia de UV-vis. La **Figura 6** muestra un desplazamiento hacia el rojo en la longitud de onda y un ensanchamiento de la banda SPR de AuNPs-AMF. Simultáneamente, la intensidad de la señal SPR disminuye a 530 nm y una nueva banda aparece alrededor de 595 nm al añadir una concentración creciente de Cr^{3+}, resultado de la agregación inducida de AuNPs-AMF por este ion. El color en las dispersiones de AuNPs-AMF es proporcional a la cantidad de Cr^{3+} añadido a las muestras, cambiando de rosa a azul, debido a la interacción entre las AuNPs-AMF y Cr^{3+}. El gráfico de calibración (relación de absorbancia A_{595}/A_{530} contra concentración Cr^{3+}) fue lineal en un intervalo de 0-50 µmol/L, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9802 (**Figura 6C**). El límite de detección encontrado para Cr^{3+} fue de 9.01 µmol/L.

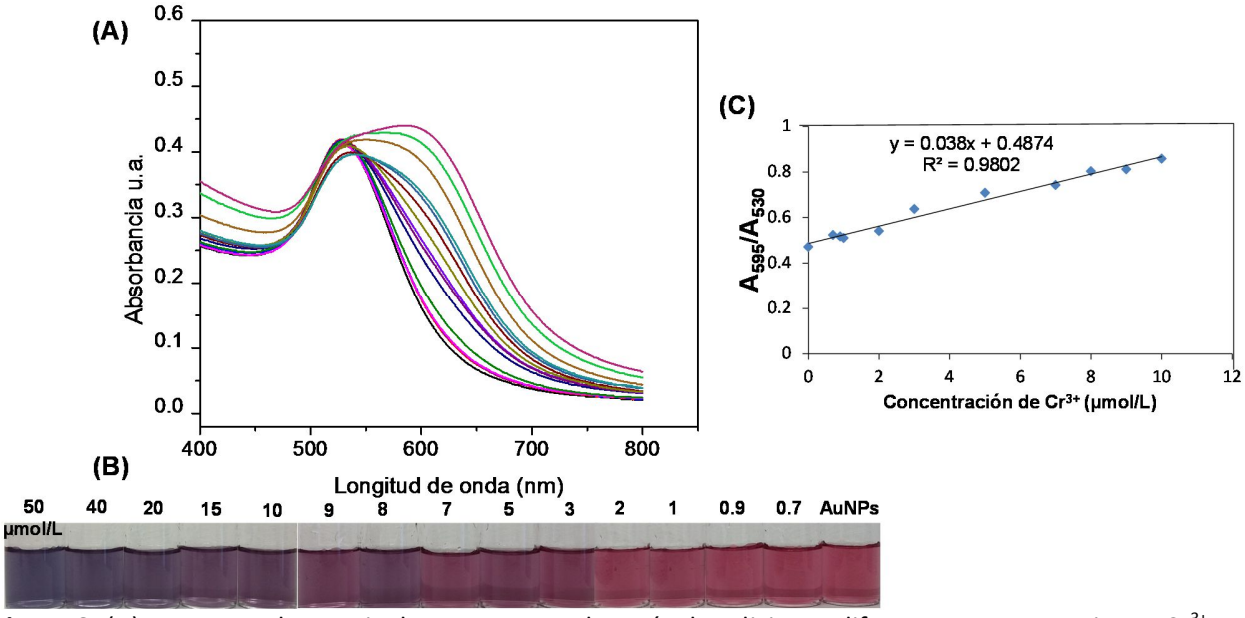


Figura 6. (A) Espectros de UV-vis de AuNPs-AMF después de adicionar diferentes concentraciones Cr^{3+} (0-50 µmol/L). (B) Imágenes fotográficas de detección colorimétrica de Cr^{3+}, (C) Gráfico de calibración A_{595}/A_{530} y concentración de Cr^{3+}.

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló un sistema colorimétrico AuNPs-AMF que puede ser usado para detectar iones de Cr^{3+} de manera efectiva. Cr^{3+} fue el único metal que indujo la agregación de AuNPs-AMF, mostrando un cambio de color en las dispersiones coloidales de rojo a azul, así como un desplazamiento en la banda de absorción de plasmón de 530 nm a 595 nm. El sistema colorimétrico es un método que permite monitorear iones de Cr^{3+} a bajas concentraciones de 9.01 µmol/L.

REFERENCIAS

[1]. P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, D. J. Sutton,Heavy Metals Toxicity and the Environment,*Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, vol. 101, pp. 133-164, 2012.

[2]. S. Bathla, T. Jain,Heavy Metals Toxicity,*Int J Health Sci Res.*, vol. 6, pp. 361-368, 2016.

[3]. R. P. Modi, V. N. Mehta, S. K. Kailasa,Bifunctionalization of silver nanoparticles with 6-mercaptonicotinic acid and melamine for simultaneous colorimetric sensing of Cr^{3+} and Ba^{2+} ions, *Sens. Actuators B: Chem.*, vol. 195, pp. 562-571, 2014.

[4]. C. Dong, G. Wu, Z. Wang, W. Ren, Y. Zhang, Z. Shen, T. Li, A. Wu,Selective colorimetric detection of Cr(III) and Cr(VI) using gallic acid capped gold nanoparticles, *Dalton Trans.*, vol. 45, pp. 8347-8354, 2016.

[5]. S. I. Hughes, S. S. R. Dasary, A. K. Singh, Z. Glenn, H. Jamison, P. C. Ray, H. Yu,Sensitive and selective detection of trivalent chromium using hyper Rayleigh scattering with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)-modified gold nanoparticles, *Sens. Actuators B: Chem.*, vol. 178, pp. 514-519, 2013.

[6]. K. A.Willets, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for probing internal cellular structure and dynamics, *Anal Bioanal Chem*, vol. 394, pp. 85-94, 2009.

7. I. Abdulhalim, M. Sourob, A. Lakhtakia,Surface Plasmon Resonance for Biosensing: A Mini Review, *Electromagnetics*, vol. 28, pp. 214-242, 2008.
8. P. M. Tiwari, K. Vig, V. A. Dennis, S. R. Singh,Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications, *Nanomaterials*, vol. 1, pp. 31-63,2011.
9. T. Lou, Z. Chen, Y. Wang, L. Chen,Blue-to-Red Colorimetric Sensing Strategy for Hg^{2+} and Ag^{+} via Redox-Regulated Surface Chemistry of Gold Nanoparticles, *Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, pp. 1568-1573, 2011.
10. L. Chen, T. Lou, C. Yu, Q. Kang, L. Chen,N-1-(2-Mercaptoethyl)thymine modification of gold nanoparticles: a highly selective and sensitive colorimetric chemosensor for Hg^{2+}, *Analyst*, vol. 136, pp. 4770-4773, 2011.
11. J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech.Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, pp. 15700-15707,2006.
12. M. C. Daniel, D. Astruc, Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 293-346, 2004.
13. A. Cruz Enriquez, I. A. Rivero Espejel,E. Andrés García, M. E. Díaz-García,Binding, Enhanced resonance light scattering properties of gold nanoparticles due to cooperative, *Anal Bioanal Chem*, vol. 391, pp. 807-815, 2008.
14. D.Su, X. Yang, Q. Xia, F. Chai, C. Wang, F. Qu,Colorimetric detection of Hg^{2+} using thioctic acid functionalized gold nanoparticles, *RSC Adv.*, pp. 24618-24624, vol. 3, 2013.
15. D. Xue, H. Wang,Y. Zhang, Specific and sensitive colorimetric detection of Al^{3+} using 5-mercaptomethyltetrazole capped gold nanoparticles in aqueous solution, *Talanta*, vol. 119, pp. 306–311, 2014.
16. F. Zhang, Y. Zhou, Y. Chen, Z. Shi, Y. Tang, T. Lu, Facile controlled preparation of phosphonic acid-functionalized gold nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci*, vol. 351, pp. 421–426, 2010.

ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE IONES CADMIO EN DISOLUCIÓN ACUOSA MEDIANTE PERLAS DE ALGINATO-SULFATO DE QUITOSANA.

[1]Espinoza-Carrión, L.G., [1]Verduzco-Navarro, I.P., [1]Mendizábal-Mijares, E., [2]Ávila-Rodríguez, M., y [1]*Ríos-Donato, N.

1. Universidad de Guadalajara, CUCEI, Departamento de Química, Blvd. Marcelino García Barragán1421, esq Calzada Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México
2. Universidad de Guanajuato, Departamento de Química, División de Ciencias Naturales, Cerro de la Venada s/n, Pueblito de Rocha, Guanajuato, Guanajuato, México.

*Autor para correspondencia: nelyrios_2002@hotmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN
El proceso de adsorción ha sido aceptado como uno de los más efectivos para la remoción de contaminantes como son los iones metálicos, ya que además de ser de bajo costo, fácil de operación, bajo consumo de reactivos, y que tiene la posibilidad de la regeneración mediante la desorción y regeneración del adsorbente. En la última década, el advenimiento de biomateriales ha permitido el desarrollo de adsorbentes amigables con el ambiente como los derivados de los biopolímeros de carragenina, quitosana o alginato. En este trabajo se preparó un composito de alginato-sulfato de quitosana en forma de perlas y con este material se realizaron estudios cinéticos de la adsorción de Cd2+ de disoluciones acuosas en un proceso por lotes (Batch). Los estudios mostraron que el tiempo óptimo de adsorción es de 120 minutos y una cinética de pseudo-segundo orden.

Palabras clave: Cadmio; perlas; adsorción; biomaterial.

REFERENCIAS
[1] E. S. Redeker and R. Blust, "Accumulation and Toxicity of Cadmium in the Aquatic Oligochaete Tubifex tubifex: A Kinetic Modeling Approach," Environ. Sci. Technol., 2004.
[2] B. Thakur, M. Biswas, K. Bandyopadhyay, and A. K. Misra, "Fixed Bed Column Adsorption Studies Using Fly Ash for Removal of Cadmium from Aqueous Solution," J. Inst. Eng. Ser. A, vol. 94, no. 3, pp. 161–168, 2013.
[3] A. Hossain, S. R. Bhattacharyya, and G. Aditya, "Biosorption of cadmium by waste shell dust of fresh water mussel lamellidens marginalis: Implications for metal bioremediation," ACS Sustain. Chem. Eng., 2015.

REMOCIÓN DE COLORANTE ROJO 40 DE SOLUCIONES ACUOSAS MEDIANTE COLUMNAS DE PERCOLACIÓN.

Verduzco-Navarro, I.P., Álvarez-Vázquez, D., Yáñez-Barragán, S.I., Jasso-Gastinel, C.F., Martínez-Madrigal, S. y *Mendizábal-Mijares, E.

Universidad de Guadalajara, CUCEI, Boulevard Marcelino García Barragán 1421, esq Calzada Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: lalomendizabal@hotmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN

El agua es una de las necesidades básicas para el sustento de la vida; sin embargo, debido a su contaminación causada por actividades industriales, agrícolas y domésticas se está convirtiendo en un grave problema el poder tener agua de buena calidad. Entre los contaminantes se encuentran los colorantes que son descargados a cuerpos receptores de agua. La adsorción es un método muy utilizado para la eliminación de contaminantes por su diseño simple, fácil operación y flexibilidad. En las últimas décadas se han desarrollo nuevos adsorbentes amigables con el medio ambiente, tales como derivados de biopolímeros de carragenina, quitosana y alginato. La remoción de contaminantes del agua a gran escala es mucho más eficiente cuando se utilizan columnas de percolación que cuando se usan procesos en lotes. En este trabajo se obtuvieron unos compositos novedosos de alginato-quitosana, los cuales se utilizaron para la adsorción del colorante Rojo 40 mediante columnas de percolación. Se encontró que al aumentar el flujo y disminuir la altura de la columna, la capacidad de adsorción de la columna disminuyó.

Palabras clave: Colorante; perlas; adsorción; biomaterial.

REFERENCIAS

[1] A. Bhatnagar, y M. Sillanpää, "Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater - A short review." Advances in Colloid and Interface Science, 152(1–2), pp. 26–38, 2009.

[2] J. S. Piccin, G. L. Dotto, M. L. G. Vieira, y L. Pinto, a a., "Kinetics and mechanism of the food dye FD&C Red 40 adsorption onto chitosan," Journal of Chemical and Engineering Data, 56(10), pp. 3759–3765, 2011

[3] S. Sekar, M. Surianarayanan, V. Ranganathan, D. R. MacFarlane, y A. B. Mandal, "Choline-based ionic liquids-enhanced biodegradation of azo dyes," Environmental Science and Technology, 46(9), pp. 4902–4908, 2012.

ADSORCIÓN DE COLORANTE ROJO 40 POR PERCOLACIÓN ACUOSA EN UNA COLUMNA EMPACADA DE PARTÍCULAS DE COMPOSITO DE QUITOSANA DISPERSA EN POLIURETANO.

Ramírez-Ortiz, V.C., Martínez-Madrigal, S., Jasso-Gastinel, C.F., Ríos-Donato, N., Martínez-Gómez, A. y *Mendizábal-Mijares, E.

Universidad de Guadalajara, CUCEI, Boulevard Marcelino García Barragán 1421, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México

*Autor para correspondencia: lalomendizabal@hotmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN

Muchas industrias utilizan una variedad de colorantes sintéticos para la fabricación de sus productos, por ejemplo, en las industrias: textil, caucho, papelera, plástico, cuero, cosmética, alimenticia, farmacéutica y minera. Éstas generan grandes volúmenes de aguas residuales con concentraciones significativas de colorantes; que por general son descargadas inapropiadamente a los drenajes municipales o en las cuencas hidrológicas. Varios gobiernos han establecido restricciones medioambientales respecto a la calidad de las aguas residuales coloreadas, y obliga a las industrias a eliminar los colorantes de sus efluentes antes de descargarlos [1]. Una solución integral y de bajo costo de operación para la eliminación total de colorante en disolución, es utilizar un proceso de purificación como la adsorción en lecho empacado con partículas de un biosorbente. Entre los biosorbentes se encuentra la quitosana, la cual forma complejos con compuestos que poseen carga negativa como las proteínas y los colorantes [2,3]. La quitosana comercial se encuentra en forma de polvo por lo que no puede ser utilizada como lecho empacado pues causa elevadas caídas de presión. Para soslayar este problema, se prepararon partículas de composito de quitosana dispersa en espuma de poliuretano, con tamaño de malla de 2.13 mm. Con ello, se obtuvo una porosidad aproximadamente de 95%, que facilitó la percolación de la fase fluida a través del lecho empacado (con una $\Delta P \approx 0$). En este trabajo, se determinaron las propiedades de adsorción de colorante rojo 40 por percolación acuosa en una columna empacada, tales como: tiempo de ruptura, altura de lecho no utilizado y capacidad de saturación. Se encontró que la captación de colorante rojo 40 en las partículas de espuma de poliuretano sin quitosana fue despreciable respecto con la de 10% masa de quitosana. Las curvas de avance obtenidas de los diferentes tratamientos no infringieron la secuencia de un proceso de adsorción en columna adecuado, incluyeron las etapas: purificación, dispersión y saturación. Se logró la eliminación total de colorante rojo 40 en un volumen de efluente de hasta 28 veces respecto al volumen de la columna, lo que implicó una elevada eficacia del composito como biodsorbente.

Palabras clave: Colorante; quitosana; poliuretano, adsorción; purificación.

REFERENCIAS

[1] Zümriye, A. (2004). Application of biosorpton for the removal of organic pollutants: a review. Process Biochemistry 40, 997-1026.

[2] Xu, D., Hein, S., Loo, S. L., Wang, K. (2008). The fixed.bed study removal on chitosan beads at high pH. Ind. Eng. Chem. Res., 47, 8796-8800.

[3] Cussler, E. L. (2007). Diffusion: mass transfer in fluid system. Cambridge University Press.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANÁLOGOS DE DIOSGENINA.

[1*]Villagómez-González, B. B. y [2]Soto-Castro, D.

1. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca,
2. CONACyT-Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca.

*Autor para correspondencia: belem.villagomez@gmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN

La herbolaría ha trascendido hasta hoy en día, y numerosas plantas e infusiones sirven como base para la medicina moderna.Trabajos recientes indican que los Productos Naturales y otros compuestos derivados de estos forman parte de aproximadamente el 35-40% del total de medicamentos que se comercializan en la actualidad [1]. Dentro de los productos naturales, las diosgeninas han tomado un papel muy importante ya que se ha demostrado su potencial en el tratamiento de enfermedades de origen inflamatorio, cáncer, diabetes, entre otras, lo que representa una alternativa para los pacientes que conllevan algún tipo de enfermedad. La diosgenina podría ser una alternativa para combatir enfermedades crónico degenerativas, sin embargo su bajo nivel de absorción vía oral y su rápida metabolización [2] lo hacen un producto selectivo y de bajo rendimiento terapéutico; por ello se plantea modificar su estructura química para aumentar la hidrosolubilidad, con ello se mejorará su absorción y biodisponibilidad.

Palabras clave: Diosgenina; estructura química; hidrosolubilidad.

REFERENCIAS

[1] Labrada, K. R. P. (2012). Síntesis y caracterizació de análogos y miméticos de saponinas espirostánicas. (Doctor en Ciencias Químicas Investigación), Universidad de la Habana, La Habana Cuba.

[2] Manda, V. K., Avula, B., Ali, Z., Wong, Y.-H., Smillie, T. J., Khan, I. A., & Khan, S. I. (2013). Characterization of in vitro ADME properties of diosgenin and dioscin from Dioscorea villosa. Planta Med, 79(15), 1421-1428.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO 4-OXO-4-(PROP-2-INO-1-ILOXI) BUTANOICO EN SÓLIDO.

[1*]Villagómez-González, B.B. y [2]Soto-Castro, D.

1. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca,
2. CONACyT-Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca.

*Autor para correspondencia: belem.villagomez@gmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN
En la actualidad en los laboratorios de química orgánica, la síntesis de compuestos complejos requieren de intermediarios que puedan acoplar dos o más compuestos, por ello la labor del químico orgánico es sintetizar moléculas que logren la unión entre diversas especies químicas. Dentro de las ventajas que presenta la síntesis de puente orgánicos está la formación de fragmentos anfifílicos que presentan la posibilidad de formar micelas, estas son vehículos autoensamblables, construidos con estructuras anfifílicas dibloque o tribloquede, donde la parte hidrofílica constituye la superficie que interacciona con el medio acuoso y la parte hidrofóbica forma el núcleo que puede encapsular fármacos o éstos pueden ser conjugados a las moléculas anfifílicas. Se ha reportado el método clásico para la síntesis del ácido 4 -oxo- 4 –(prop-2-ino-1-iloxi) butanoico mediante condiciones clásicas por apertura del anhidridro succínico con alcohol propargilico en presencia de trietil amida y DMAP [1], utilizando reactivos tóxico y peligrosos causando un alto impacto ambiental lo cual hace urgente la implementación de nuevas estrategias de síntesis. Por ello en el presente trabajo se muestra la reacción en solido del anhidridro succinico con alcohol propargilico en mortero. La apertura del anhidro succínico es mediante la formación del alcoxido del alcohol propargilico con KOH; esta reacción resulta ser una estrategia verde, siendo amigable para el medio ambiente ya que se retiran el DMAP y la trietil amina los cuales son compuestos tóxicos y peligrosos; así mismo esta nueva síntesis se caracteriza por ser un método más económico ya que al no utilizar algunos compuestos esto mejora el costo del producto, aunado a esto se requiere un menor tiempo tanto para la síntesis como para la purificación, en comparación al que se describe en literatura. Este intermediario en la actualidad es utilizado para varios tipos de síntesis por ejemplo ser unido vía ester por medio de una esterificación o mediante reacciones click por la parte de su alquilo y en muchos casos para la formación de dendrimeros, es por ello que nuevas estrategias encaminadas en la eliminación o minimización de residuos químicos implementeran procesos sostenibles [2] en la química verde.

Palabras clave: Sintesis; ácido 4-oxo-4-(prop-2-ino-1-iloxi) butanoico.

REFERENCIAS

[1] Ni, B., Dong, X. H., Chen, Z., Lin, Z., Li, Y., Huang, M., ... & Zhang, W. B. (2014). "Clicking" fluorinated polyhedral oligomeric silsesquioxane onto polymers: a modular approach toward shape amphiphiles with fluorous molecular clusters. Polymer Chemistry, 5(11), 3588-3597.

[2] Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. Chemical Society Reviews, 39(1), 301-312.

FRACCIONAMIENTO DE UN ACEITE ESENCIAL DE TORONJA MEDIANTE DESTILACIÓN MOLECULAR.

Campos-Carrillo, S.E., García-Fajardo, J.A., Estarrón-Espinosa, M., Padilla-De la Rosa, J.D., *Ponce-Hernández, J.S.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Av. Normalistas #800, Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, México 44270.

*Autor para correspondencia: sponce@ciatej.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN
El objetivo de este estudio fue el fraccionar el aceite esencial de toronja por destilación molecular para obtener fracciones terpénicas. La composición de los destilados y del residuo fue analizada por inyección directa en un sistema CG-EM para identificar y cuantificar los principales compuestos volátiles, posteriormente los datos fueron sometidos a un modelo estadístico unifactorial por bloques al azar y posterior análisis de varianza, mostrando una correlación entre la velocidad de flujo de alimentación y el porcentaje de los compuestos observados en el cromatograma de los destilados y residuos obtenidos del proceso de destilación molecular.

Palabras clave: Fraccionamiento; purificación; aceite esencial; terpenos; destilación molecular.

INTRODUCCIÓN

En años recientes ha habido un creciente interés en la búsqueda de productos naturales activos, como los aceites esenciales y los extractos de algunas plantas para el desarrollo de aditivos alternativos. Esta situación ha motivado a la industria a buscar sistemas que permitan la concentración o purificación de dichos compuestos activos, presentes en fuentes renovables [1].

El aceite esencial de toronja (AET) se encuentra constituido principalmente por terpenos, los cuales contribuyen poco al aroma. Por esto, el aceite es sometido a un proceso de desterpenación con la intención de enriquecer la fracción de compuestos oxigenados, responsables del aroma [2]. Sin embargo, los procesos tradicionales de desterpenación utilizan cantidades considerables de solventes que ocasionan daños al medio ambiente y la salud.

La destilación molecular es el método, generalmente considerado, como el más apropiado para separar compuestos volátiles sensibles al calor. Se ha reportado que exhibe un excelente desempeño para separar o purificar mezclas con altos puntos de ebullición [3]. Es una operación de alto vacío que causa un descenso en la temperatura de ebullición de las sustancias. Esta característica, combinada con bajos tiempos de residencia, permiten la concentración o purificación de compuestos de interés sin deterioros de sus propiedades naturales. Existe poca información disponible acerca de la aplicación de la destilación molecular para obtener fracciones enriquecidas o purificadas de aceites esenciales [1].

En una operación de destilación molecular se pretende aprovechar los diferentes grados de volatilidad de las sustancias que constituyen la mezcla. Por otro lado la volatilidad que posee cada sustancia depende de la naturaleza propia de éstas, así como de las condiciones en las que se efectúa la separación. En general dada una presión una sustancia se volatiliza más que otra según la temperatura a la que se encuentra, de esta manera los componentes más volátiles se separan en cada una de las etapas sucesivas de evaporación, teniendo cada etapa condiciones de operación que les favorecen [4]. En el equipo se crea una película delgada que cae por las paredes evaporadoras del mismo por efecto de la gravedad, formando así una película continua de material; y en equipos como el Destilador Molecular de ruta corta, la superficie evaporadora se encuentra separada a pocos centímetros de la superficie condensadora, de esta forma el AE es procesado en un mínimo periodo de tiempo con temperaturas relativamente bajas debido al vacío con el que trabaja el equipo, lo que permite mantener las características importantes de los mismos [4].

MATERIALES Y MÉTODOS

Destilación molecular

Para realizar la destilación molecular se tomaron 100 mL de aceite esencial de toronja variedad rosa y 100 mL de aceite esencial de toronja variedad star ruby, los cuales fueron suministrados por la empresa Frutech y Kimmkaal respectivamente. Se estudió el efecto del flujo de alimentación (5 y 10 mL/min) a una temperatura de evaporación constante de 80 ºC y una presión de 10 Torr, se evaluaron el rendimiento y composición de los principales compuestos presentes en el destilado y residuo obtenidos [2].

La destilación molecular se llevó a cabo en un equipo InCon ICL-04 Short Path con una superficie de evaporación de 0.04 m^2 y un condensador en forma de serpentín de 3/8" de diámetro interno. El destilador está equipado con rodillos *wiper* de velocidad variable dentro de la cámara de evaporación, misma en la que se alimenta el sistema y se obtienen dos fracciones, el destilado y el residuo. La composición de los destilados y del residuo fue analizada por inyección directa en un sistema CG-EM para identificar y cuantificar los principales compuestos volátiles.

Análisis cromatográfico

Para evaluar los componentes volátiles de interés, la muestra fue inyectada directamente mediante un autoinyector en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890B acoplado a un espectrómetro de masas 5977A (CG-EM). La separación de los componentes se efectuó en una columna capilar HP-5MS de 30m x 0.25mm DI x 0.25 m de espesor. El horno fue programado a 65°C durante 3 min, incrementando hasta 260°C con un gradiente de 4°C/min, manteniendo 15 minutos. El flujo del gas acarreador (He) fue de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 0.5 ml en modo split a una temperatura de 250 °C. El detector se mantuvo a una temperatura de 270°C, operando a 70 eV. La identificación del limoneno y nookatona se basó en la comparación de espectros de los picos en la muestra con los de la biblioteca NIST05L e índices de retención de la bibliografía. La concentración de los compuestos de interés se reporta en base al área de los picos (unidades de área x 10^6, UA).

Análisis estadístico

Se realizó un diseño unifactorial por bloques al azar, donde el factor bloqueado fue la materia prima (star ruby, rosa) y el factor de estudio fue el flujo de alimentación con 2 niveles (5 mL/min y 10 mL/min) y posterior análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software estadístico Stat Graphics Centurion XVI.

Las variables de respuesta fueron el porcentaje de volumen de destilado, así como concentración de limoneno y nootkatona en el destilado y en el residuo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de destilado

Una vez obtenidas las fracciones del destilador molecular, se procedió a analizar los datos mediante análisis estadístico. De acuerdo al ANOVA (Tabla 1), se evidenció que sí hubo diferencia estadística significativa en cuanto al porcentaje del destilado recuperado debido al efecto del flujo de alimentación con un nivel de confianza del 90 %, Figura 1.

Tabla 1. Análisis de varianza para % de destilado.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Efectos principales					
A:Flujo	75.69	1	75.69	118.27	0.0584
B:Bloque	0.81	1	0.81	1.27	0.4626
Residuos	0.64	1	0.64		
TOTAL (CORREGIDO)	77.14	3			

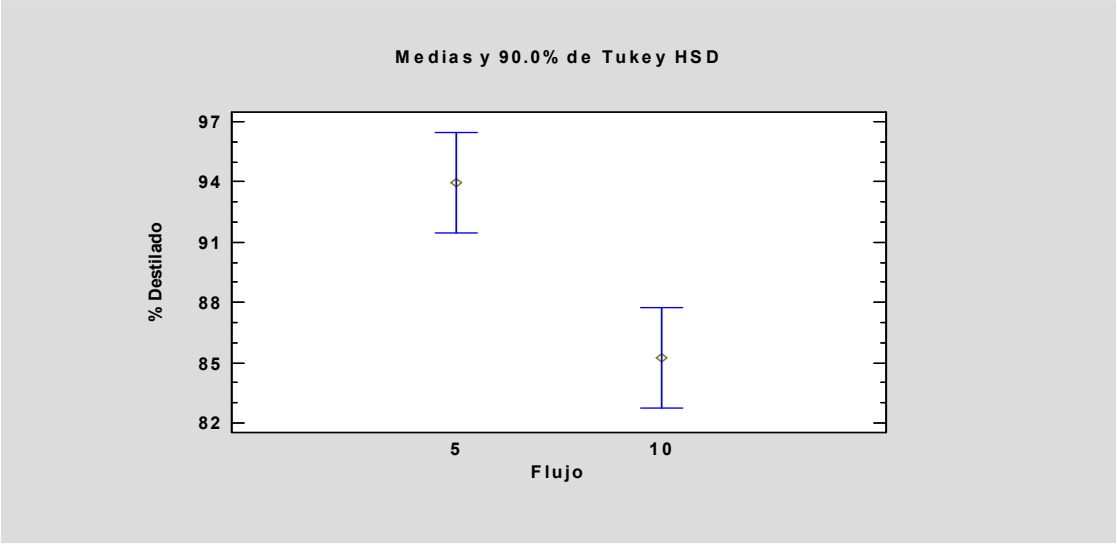


Figura 1. Gráfica de comparación de medias para % de destilado.

Coincidió en ambos casos que con flujos de 5 mL/min se obtuvo un mayor porcentaje en el contenido del destilado y una disminución en el porcentaje de residuo recuperado.

Concentración de limoneno y nootkatona en el destilado

De los datos cromatográficos, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 90 % en la concentración de limoneno obtenido en el destilado (Figura 2), y que sean atribuibles al efecto del flujo de alimentación.

Por otra parte, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de nootkatona en el destilado por efecto del flujo con un nivel de confianza del 85 % (Figura 3). Aunado a lo anterior, se observó que la variedad de toronja analizada ejerció una influencia sobre el contenido de nootkatona en el destilado, Tabla 2.

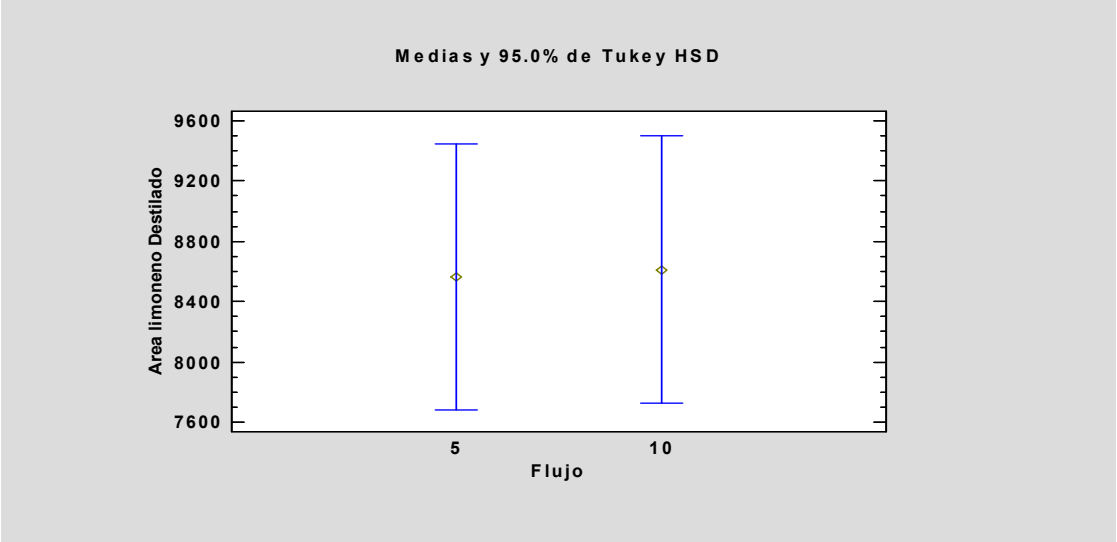


Figura 2. Gráfica de comparación de medias para el área de limoneno en el destilado.

Tabla 2. Análisis de varianza para área de nootkatona en el destilado.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Flujo	0.0909927	1	0.0909927	18.39	0.1459
B:BLOQUE	0.771499	1	0.771499	155.89	0.0509
RESIDUOS	0.00494912	1	0.00494912		
TOTAL (CORREGIDO)	0.867441	3			

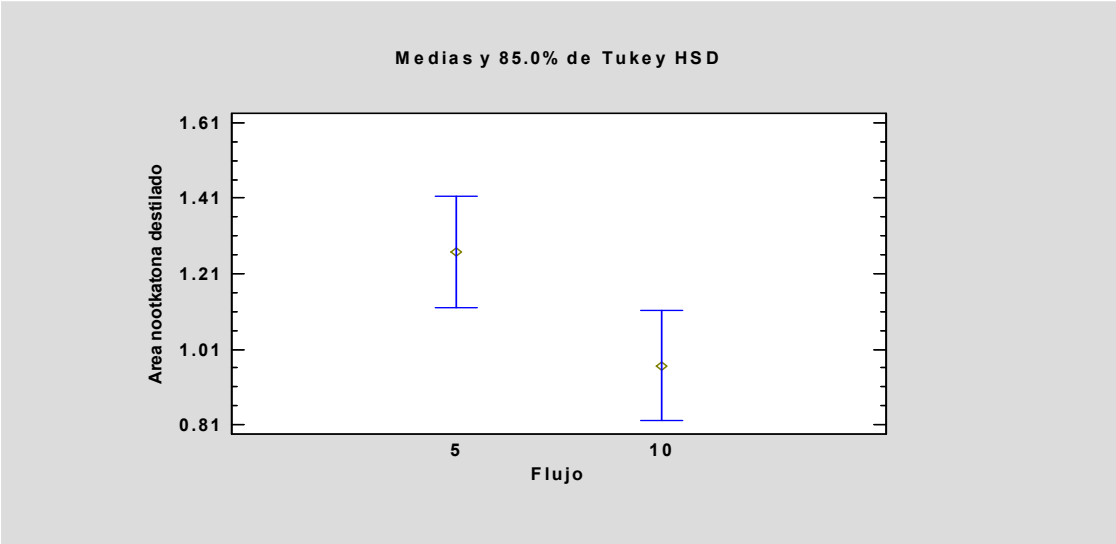


Figura 3. Gráfica de comparación de medias para el área de nootkatona en el destilado.

Concentración de limoneno y nookatona en el residuo

El análisis de varianza de los componentes de interés en el residuo recuperado, mostró que existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de limoneno en el residuo por efecto del flujo con un nivel de confianza del 85 %, Tabla 3, Figura 3.

Tabla 3. Análisis de varianza para el área de limoneno en el residuo.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Flujo	5963.78	1	5963.78	30.23	0.1145
B:BLOQUE	230.599	1	230.599	1.17	0.4752
RESIDUOS	197.276	1	197.276		
TOTAL (CORREGIDO)	6391.65	3			

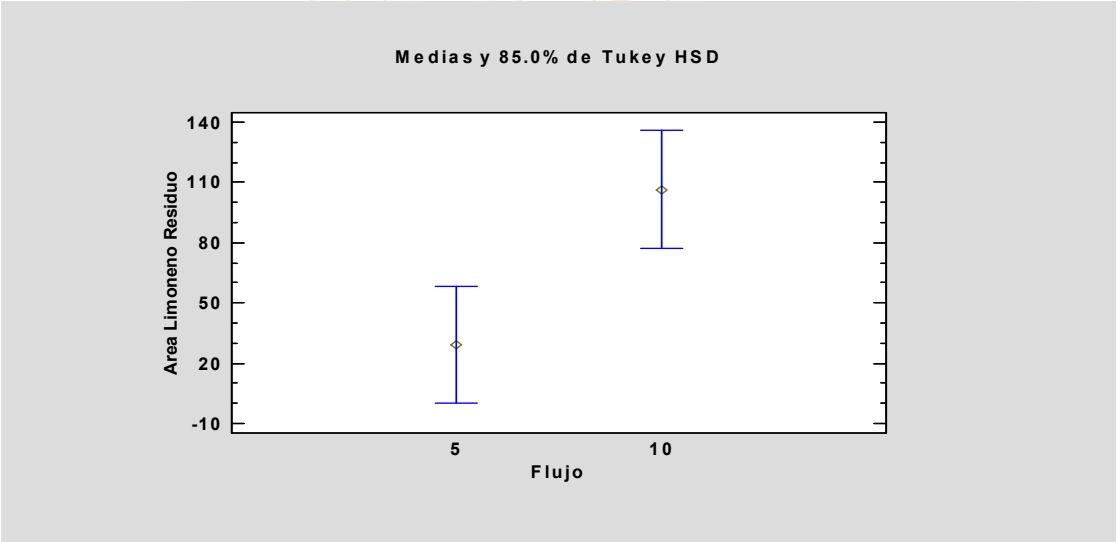


Figura 4. Gráfica de comparación de medias para el área de limoneno en el residuo.

Con respecto a la nookatona, no hubo diferencias estadísticamente significativas en su concentración en el residuo por efecto del flujo (Tabla 4), con un nivel de confianza del 85 %. Sin embargo, al igual que en el destilado se puede observar una diferencia en cuanto a la concentración, atribuida a la variedad de toronja analizada, Figura 5.

Tabla 4. Análisis de varianza para área de nootkatona en el residuo.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Flujo	10.0046	1	10.0046	1.71	0.4160
B:BLOQUE	140.849	1	140.849	24.01	0.1282
RESIDUOS	5.86608	1	5.86608		
TOTAL (CORREGIDO)	156.72	3			

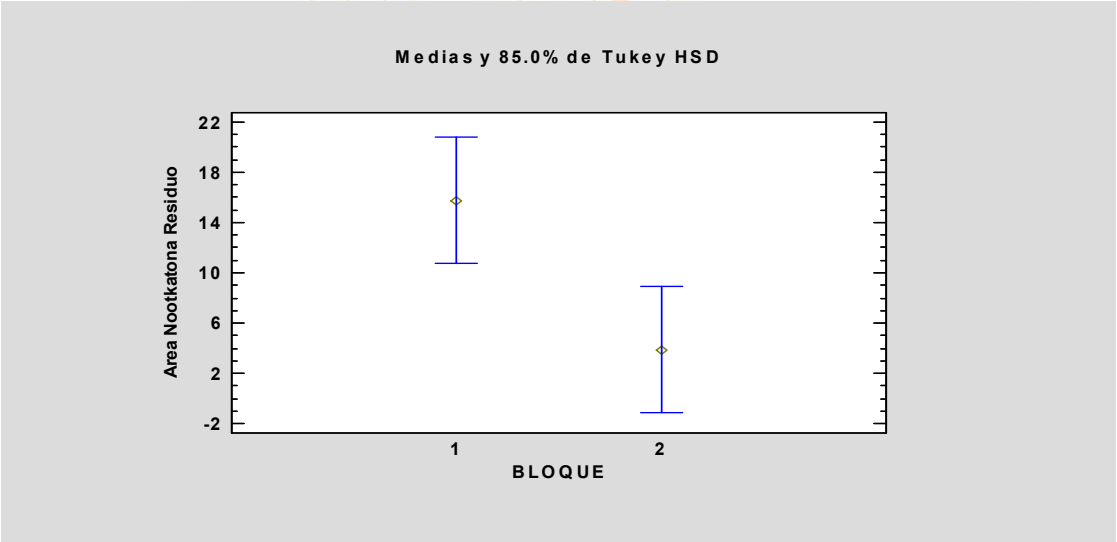


Figura 5. Gráfica de comparación de medias para el área de nootkatona en el residuo.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de los análisis estadísticos realizados, se concluye que:

1. El flujo de alimentación empleado durante el proceso de destilación molecular impactó en los porcentajes de destilados y residuos obtenidos. A un flujo de 5 mL/min, se obtuvieron mayores porcentajes de destilados y menores de residuo en comparación con los obtenidos a flujos de 10 mL/min.
2. A pesar de ser similares, las concentraciones de los compuestos presentes tanto en los destilados como en los residuos se vieron influenciados por el bloque analizado (variedad de toronja), si bien, estadísticamente fue similar para el contenido de limoneno, para nootkatona sí se apreció el impacto en cuanto a la concentración, tanto en el destilado como en el residuo.
3. El proceso de destilación molecular resulta ser una opción viable para concentrar compuestos que se encuentran en los aceites esenciales y los cuales son de alto valor agregado.
4. Es necesario realizar estudios a flujos de alimentación menores para conocer más a detalle el desempeño del proceso de destilación molecular.

REFERENCIAS

[1].- V. Borgello, G. N. Mezza, M. C. Pramparo, and M.F. Gayol, "Thymol enrichment from oregano essential oil by molecular distillation," Seppur J., vol. 153, pp. 60-66, 2015

[2].- P.F. Martins, H.H.R. Medeiros, P. Sbaite, and M. R. Wolf Maciel, "Enrichment of oxyterpenes from orange oil by short path evaporation," Seppur J., vol. 116, pp. 385-390, 2013

[3].- J. Yu, X. Yuan, and A. Zeng, "A novel purification process for dodecanedioic acid by molecular distillation," CJCHE J., vol. 23, pp. 499-504

[4].- J. M. Pedroni, "El destilador molecular y sus aplicaciones en la industria de aceites y grasas," pp. 1-7, 2007

ENCAPSULACIÓN POR GELIFICACIÓN IÓNICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CON ALGINATO DE SODIO Y MUCÍLAGO DE CHÍA (*Salvia hispanica*).

Hernández-Hernández, M., Polanco-Lugo, E.M.A., Martínez-Castillo, J.I., Pacheco-López, N.A., y *Ayora-Talavera, T.R.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad Sureste, Parque Científico Tecnológico de Yucatán, km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Mérida, Yucatán.

*Autor para correspondencia: tayora@ciatej.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

Estudios recientes han demostrado el efecto antioxidante de los polifenoles contenidos en extractos acuosos de hojas de *S. rebaudiana*. En este sentido, la microencapsulación puede ser empleada para proteger a los polifenoles. Una fracción del extracto acuoso de estevia (36.39±2.25 mg de ácido gálico/g) con actividad antioxidante (IC_{50} de 7.45±0.5 mg) fue encapsulada por gelificación iónica en una matriz de alginato de sodio (As) y mucílago de chía (Mc). Las mejores condiciones de encapsulación se obtuvieron por un diseño factorial 2^3 con cuatro puntos centrales donde la variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición del radical DPPH. Efectos significativos (p<0.05) asociados al proceso de microencapsulación fueron obtenidos con la tasa de biopolímeros (As:Mc), y la interacción tasa de biopolímeros- concentración del agente entrecruzante ($CaCl_2$). Las microesferas mostraron morfología irregular a mayor sustitución de alginato de sodio. Los polifenoles liberados de las microesferas mostraron contenidos de 18.60-27.73 mg/g eq de ácido gálico y 42.03–55.21% de inhibición del radical DPPH. Los mejores tratamientos que permitieron la inhibición del radical fueron 8:2, 0.2M, 10 min (54.55%) y 8:2, 0.2 M, 20 min (55.21%).

Palabras clave: Microencapsulación; antioxidante; polifenoles; estevia; mucilago.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de antioxidantes seguros y eficaces se centra actualmente en diversos compuestos de origen vegetal provenientes de plantas comestibles [1]. Estevia es una hierba perenne de alto valor económico, y ampliamente conocida debido a su contenido de más de 30 glicosidos diterpenicos de sabor dulce (esteviósido y rebaudiósido A) aprobados como aditivos alimentarios. Aunque también se ha reportado la presencia de flavonoides, fitoesteroles, alcaloides, clorofilas, xantofilas, ácidos hidroxicinámicos, oligosacáridos, aminoácidos, lípidos, vitaminas solubles y minerales [2]. Las hojas se utilizan para la extracción y producción de ingredientes biofuncionales (no calóricos, no fenilcetonúricos, y con actividad antioxidante), y para la obtención de biomoléculas con alto valor nutricional (proteínas, fibra y carbohidratos)[3]. La actividad antioxidante que posee ha sido correlacionada con contenidos de fenoles y flavonoides [4]. Sin embargo, estas biomoléculas son altamente sensibles al calor y a la luz, lo cual limita su almacenamiento. Por otra parte, *Salvia hispánica* (chía) es conocida por sus propiedades asociadas a la salud [5], [6]. Las semillas son una fuente potencial de componentes nutracèuticos para el

enriquecimiento de formulaciones alimentarias especializadas [7], y piensos [5]. La semilla posee altos contenidos de ácidos grasos insaturados (omega 3 y 6) [6], proteínas de alto valor biológico [5], [8], y fibras mucilaginosas localizadas en estructuras celulares del pericarpio estratificado de la semilla. Estas fibras son capaces de ser exudadas a partir de su hidratación en agua, y resultan de particular interés debido a su capacidad de retener agua, formar geles transparentes y altamente viscosos [9], [10], y probablemente de crear barreras físicas entre carbohidratos y enzimas digestivas [11]. Es por esto que en general, este tipo de hidrocoloides se emplean para diferentes aplicaciones alimentarias debido a su capacidad de retención de agua, impartición de textura suave [6], además de su propiedad de gelificación, control en la sinéresis y estabilización de las emulsiones, entre otras funcionalidades [5], [8], [9].

La encapsulación es una tecnología prometedora para proteger el componente bioactivo sometidos a condiciones desfavorables, contribuyendo así a incrementar su vida media y promover su liberación controlada [12]. Una solución potencial para mantener la estabilidad durante el almacenamiento de compuestos polifenólicos es la microencapsulación mediante el empleo de matrices no tóxicas y biodegradables. Por lo anterior, la evaluación de la encapsulación por gelificación iónica de extractos acuosos de estevia con matrices encapsulantes de mucílago de chía (Salvia hispanica) y alginato de sodio, podría contribuir a preservar la actividad de estos compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de materia prima: hoja en polvo, y extracto acuoso de S. rebaudiana

Las hojas de estevia se colectaron de cultivos comerciales en la localidad de Tizimìn, Yucatán, México, se deshidrataron, pulverizaron, tamizaron (297 µm) y almacenaron a 25°C hasta su empleo. El proceso de extracción de glucósidos diterpénicos y polifenoles se realizó mediante maceración en agua a 50°C. Se preparó una dispersión de hoja en polvo (1:40, p/v), se mantuvo en agitación constante (2 h). Al término, el extracto acuoso se recuperó por centrifugación (4500 rpm/20 min/4°C) y almacenó a 5°C hasta su empleo.

Caracterización del extracto acuoso de S. rebaudiana

El extracto acuoso de estevia fue caracterizado por su contenido de polifenoles y actividad antioxidante. El contenido de polifenoles totales se determinó mediante Folin-Cicolteu [13], empleando ácido gálico como estándar. La actividad antioxidante, se evaluó mediante 1,1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH) a partir de cinéticas de inhibición durante 6 min a 517 nm, empleando 0.3 mL del extracto acuoso (a diferentes diluciones) y 2.7 mL de la solución metanólica de DPPH (60.4 µM). La actividad antiradical se expresó en términos de IC_{50}.

Obtención de mucilago de S. hispanica

Las semillas de chía (marca Wand's, Abastecedora y Comercilizadora Walls) fueron procesadas para la extracción del mucílago, sin previo desengrasado de las semillas [14]. Las semillas enteras se dispersaron en agua (1:30, p/v), durante 2 h a 25°C. Al término, el extracto mucilaginoso se concentró. Posteriormente se precipitó (etanol al 96%), secó (50°C), molió, tamizó (297 µm) y almacenó en desecador.

Encapsulación por gelificación iónica de extractos acuosos de S. rebaudiana

Un diseño factorial 2^3 con 4 réplicas al tratamiento central fue empleado, siendo los factores y niveles, la relación de biopolímeros As:Mc (9:1 y 10:0), la concentración del agente entrecruzante (0.1 y 0.2 M) y el tiempo de formación de la microesfera en la solución catiónica (10 y 20 min). La variable de respuesta fue la actividad antioxidante residual en el material a proteger. El análisis de datos se realizó mediante el Software estadistico Statgraphics centurion XVI.I. Se realizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%.

La encapsulación de los extractos se realizó mediante modificaciones a Aceval *et al.* [1]. Las microesferas se obtuvieron a partir de la dispersión de las matrices encapsulantes en el extracto acuoso (2%, p/v), durante 20 min a 25°C. Posteriormente, la formación de las microesferas se llevó a cabo por la adición de goticulas de la dispersión en la solución de $CaCl_2$ (0.1 y 0.2 M) a una velocidad constante mediante una bomba peristáltica. Las microesferas se mantuvieron en las soluciones de $CaCl_2$ durante 10 y 20 min. Posteriormente, se filtraron, lavaron con agua destilada, y almacenaron a 5ºC protegidas de la luz.

Caracterización de microesferas con extractos acuosos de S. rebaudiana

Las microcápsulas fueron caracterizadas en fresco de acuerdo a tamaño y forma, contenido de polifenoles y actividad antioxidante residual. Adicionalmente la viscosidad de la matriz con el extracto (biopolímero-extracto acuoso) fue determinada.

- La morfología y tamaño de las microcápsulas fueron definidas por microscopia óptica (10X), para lo cual se determinó la forma y el diámetro promedio de 10 microcápsulas.
- El contenido de polifenoles se realizó de acuerdo al procedimiento mencionado. La apertura de las microcapsulas se realizó de acuerdo a Deladino et al. (2013).
- La actividad antioxidante se evaluó a partir de la inhibición de DPPH con modificaciones [15], para lo cual se mezcló 500 µL del extracto encapsulado con 500 µL de solución metanólica de DPPH (0.1 M). La mezcla se incubó en obscuridad a 25°C por 30 min, y la absorbancia fue determinada a 517 nm. La actividad antiradical se expresó como porcentaje de inhibición.
- La viscosidad se determinó con un viscosímetro (Brookfield DVIII) empleando una aguja RV-16. La viscosidad de las muestras (7 mL) se definió en función a velocidades de corte linealmente crecientes (0.01-100 rpm) a 25°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracto acuoso de S. rebaudiana.

El contenido de polifenoles totales en el extracto acuoso de las hojas de estevia fue de 36.39±2.25 mg EAG/g, el cual es menor al reportado en extractos acuosos obtenidos a partir de polvo de hojas de estevia [1]. En este sentido, probablemente la temperatura empleada (50ºC) influyó en la obtención de bajos contenidos de polifenoles, debido a que el factor temperatura influye en la transferencia de masa e incremento de la solubilidad de los compuestos fenólicos [16]. El potencial antioxidante de los extractos acuosos presentó IC_{50} 7.45±0.5 mg, lo cual sugiere que pequeñas dosis del extracto podrían contribuir a múltiples beneficios para la salud. A este respecto, los polifenoles poseen una estructura química capaz de actuar como captadores de radicales libres neutralizando especies reactivas de oxígeno y iones metálicos [17].

Microesferas con extractos acuosos de S. rebaudiana

Los mayores contenidos de polifenoles fueron obtenidos en microesferas constituidas por una mayor sustitución de alginato de sodio en la matriz encapsulante. La actividad antioxidante de las microesferas, indicó que los mayores porcentajes de inhibición al radical DPPH se obtuvieron en microesferas con relaciones de biopolímeros 8:2 (As:Mc), siendo los tratamientos 3 y 7, los que presentaron un mayor porcentaje de inhibición (54.55 y 55.21%, respectivamente) (Tabla 1). En este sentido, es posible sugerir que una mayor relación del mucílago contribuye a potenciar el efecto gelificante del alginato. Por otra parte, las microesferas con relaciones de biopolímeros 10:0 (As:Mc) presentaron los menores contenidos de polifenoles. Esto probablemente se deba a la estructura porosa del alginato [18]. De acuerdo a los resultados obtenidos la mayor actividad antioxidante está relacionada con el mayor contenido de polifenoles contenidos en las microesferas [19].

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de DPPH de extractos acuosos encapsulados de *S. rebaudiana*.

Tratamiento	Tasa de biopolímeros (As:Mc)	Concentración $CaCl_2$ (M)	Tiempo (min)	Inhibición DPPH (%)
1	8:2	0.1	10	49.33
2	10:0	0.1	10	44.02
3	8:2	0.2	10	54.55
4	10:0	0.2	10	42.03
5	8:2	0.1	20	46.96
6	10:0	0.1	20	44.59
7	8:2	0.2	20	55.21
8	10:0	0.2	20	38.33
9	9:1	0.15	15	48.35
10	9:1	0.15	15	48.86
11	9:1	015	15	49.85
12	9:1	0.15	15	49.63

El análisis estadístico indicó que el mucílago influye de manera significativa (p= 0.0005) en la actividad antioxidante residual de las microesferas. Esto debido a que el efecto sinérgico del complejo en la matriz alginato:mucílago protege eficazmente los compuestos polifenólicos de *S. rebaudiana*. De igual manera, tal y como se observa en el diagrama de Pareto (Figura 1), la interacción entre la relación de biopolímeros y la concentración de $CaCl_2$ influye significativamente, aunque en menor medida en la variable de respuesta (p= 0.0073). Por otra parte, el "tiempo de formación de las microesferas en la solución catiónica", no fue un factor que afectara la protección de los compuestos fenólicos e influyera en el porcentaje de inhibición del radical. Sin embargo, este factor si influyó en el tamaño de las microesferas.

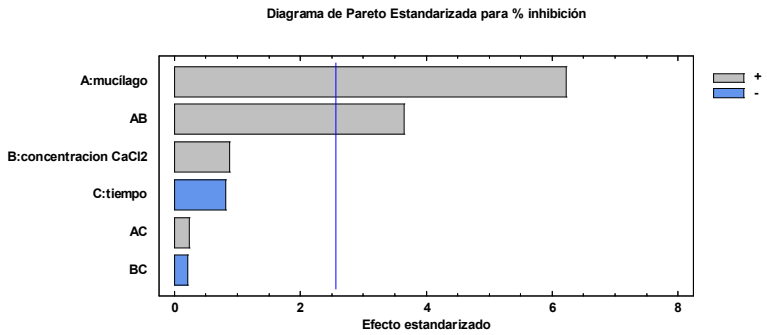


Figura 1. Diagrama de Pareto para los efectos principales: tasa de mucílago (A); concentración de agente entrecruzante (B); tiempo en solución catiónica (C).

Las microesferas con alginato (10:0) presentaron superficie lisa, forma esférica con diámetro aproximadamente de 7.10 ± 0.65 mm. Mientras que las microesferas con alginato-mucílago exhibieron mayor variabilidad en el diámetro, 6.76 ± 0.35 (9:1) y 5 ± 0.52 (8:2), así como formas irregulares y rugosidad en partes superficiales en relaciones con mayor contenido de mucílago (Figura 2). Los resultados indicaron que la adición del mucílago derivó en la formación de microesferas probablemente más compactas, pero no implicó necesariamente concomitancia con la circularidad. Cabe señalar que las microesferas fueron analizadas en fresco, por lo que el tamaño y forma final probablemente varíen con el método de secado [20].

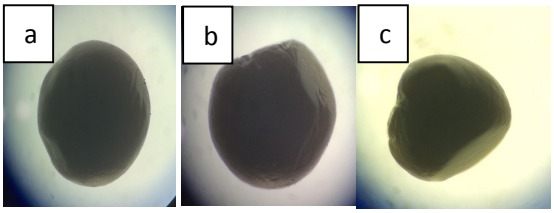


Figura 2. Microesferas de extractos acuosos de estevia observadas por microscopia óptica (10X).
a) 10:0, 0.1 M, 10 min; b) 9:1, 015 M, 15 min; c) 8:2, 01M, 10 min.

La viscosidad de las diferentes relaciones de biopolímeros (As:Mc) empleadas fue mayor a medida que incrementó la sustitución del alginato de sodio, esto es 2309.0, 1934, y 1760.40 mPas, para las relaciones 8:2, 9:1 y 10:0, respectivamente. Por lo que es posible sugerir que la viscosidad influyó en la forma de la gotícula y por ende en la forma de la microesfera.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la microencapsulación por gelificación iónica mediante alginato-mucílago de *Salvia hispanica* puede ser empleada como un sistema para la protección y preservación de compuesto polifenólicos presentes en extractos acuosos de *Stevia rebaudiana.*

REFERENCIAS

[1] N. D. Aceval Arriola, P. M. De Medeiros, E. S. Prudencio, C. M. Olivera Müller, and R. D. De Mello Castanho Amboni, "Encapsulation of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content," *Food Biosci.*, vol. 13, pp. 32–40, 2016.

[2] U. Wölwer-Rieck, "The Leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 886–895, 2012.

[3] M. A. A. Gasmalla, R. Yang, I. Amadou, and X. Hua, "Nutritional Composition of Stevia rebaudiana Bertoni Leaf : Effect of Drying Method," *Trop. J. Pharm. Res. J*, vol. 13, no. 1, pp. 61–65, 2014.

[4] G. Rao Narsin, P. Rao Pamidighantam, K. Balaswamy, and A. Satyanarayana, "Antioxidant activity of Stevia (Stevia rebaudiana L .) leaf powder and a commercial stevioside powder," *J. Food Pharm. Sci.*, vol. 2, pp. 32–38, 2014.

[5] L. A. Muñoz, A. Cobos, O. Diaz, and J. M. Aguilera, "Chia seeds : Microstructure, mucilage extraction and hydration," *J. Food Eng.*, vol. 108, pp. 216–224, 2012.

[6] G. E. Inglett and D. Chen, "Processing and physical properties of chia-oat hydrocolloids," *J. Food Process. Preserv. ISSN*, vol. 38, pp. 2099–2107, 2014.

[7] M. Segura-Campos, Z. Acosta-Chi, G. Rosado-Rubio, L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona, "Whole and crushed nutlets of chia (Salvia hispanica) from Mexico as a source of functional gums," *Food Sci. Technol.*, vol. 34, no. 4, pp. 701–709, 2014.

[8] M. R. Segura-campos, N. Ciau-solís, G. Rosado-Rubio, L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona, "Physicochemical characterization of chia (Salvia hispanica) seed oil from Yucatán , México," *Agric. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 220–226, 2014.

[9] L. A. Muñoz, J. M. Aguilera, L. Rodriguez-Turienzo, A. Cobos, and O. Diaz, "Characterization and microstructure of films made from mucilage of Salvia hispanica and whey protein concentrate," *J. Food Eng.*, vol. 111, pp. 511–518, 2012.

[10] M. I. Capitani, V. Spotorno, S. M. Nolasco, and M. C. Tomás, "Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (Salvia hispanica L .) seeds of Argentina," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 1, pp. 94–102, 2012.

[11] M. A. Rubio, "Implicaciones de la fibra en distintas patologías," *Nutr. Hosp.*, vol. XVII, no. 2, pp. 17–29, 2002.

[12] L. Aberkane, G. Roudaut, and R. Saurel, "Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 7, no. 5, pp. 1505–1517, 2014.

[13] C. Vasco, J. Ruales, and A. Kamal-Eldin, "Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador," *Food Chem.*, vol. 111, no. 4, pp. 816–823, 2008.

[14] M. Dick, T. M. H. Costa, A. Gomaa, M. Subirade, A. D. O. Rios, and S. H. Flôres, "Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties," *Carbohydr. Polym.*, vol. 130, pp. 198–205, 2015.

[15] B. Guzmán-Méndez, M. E. Jaramillo-Flores, L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona, "Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from Phaseolus lunatus and hard-to-cook Phaseolus vulgaris," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 49, no. 8, pp. 1859–1868, 2014.

[16] J. E. Cacace and G. Mazza, "Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol," *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 1, pp. 240–248, 2003.

[17] M. Daglia, "Polyphenols as antimicrobial agents," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 23, no. 2, pp. 174–181, 2012.

[18] L. Deladino, P. S. Anbinder, A. S. Navarro, and M. . Martino, "Encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis," *Carbohydr. Polym.*, vol. 71, pp. 126–134, 2008.

[19] I. F. Pérez-Ramírez, E. Castaño-Tostado, J. A. Ramírez de León, N. Rocha-Guzmán, and R. Reynoso-Camacho, "Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a ...," *Food Chem.*, vol. 172, pp. 885–892, 2015.

[20] Santagapita, P.R., M. F. Mazzobre, and M. D. . Buera, "Invertase stability in alginate beads: Effect of trehalose and chitosan inclusión and of drying methods," *Food Res. Int.*, vol. 47, no. 2, pp. 321–330, 2012.

NANO ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE SUBPRODUCTOS AGRO INDUSTRIALES PARA EVALUAR SU EFECTO PROTECTOR DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.

[1]Martínez-Candela, E., [1]Padilla-de la Rosa, J.D., [2*]Vallejo-Cardona, A.A.

1. Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Av. Normalistas No. 800, C.P. 44720, Guadalajara, Jalisco, México.
2. Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (CONACyT-CIATEJ), Av. Normalistas No. 800, C.P. 44720, Guadalajara, Jalisco, México..

*Autor para correspondencia: avallejo@ciatej.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN
El cáncer de piel es el más frecuente en los seres humanos, pues cada año se diagnostican dos millones de nuevos casos en todo el mundo. En México ocupa el primer lugar de incidencia entre los hombres y el tercero entre las mujeres" (Magaña, 2014). Uno de los factores principales al que se le atribuye como detonador del cáncer de piel, es la excesiva e inadecuada exposición solar durante tiempos prolongados en ausencia del uso de protectores solares. Por otro lado los liposomas han ido generando un gran impacto en la industria de cosmetología por su biocompatibilidad, liberación prolongada y controlada del moléculas activas, entre otras cualidades. Por lo que en este proyecto de investigación se propone encapsular en liposomas compuestos como la hesperidina, ácido ferúlico y extractos antioxidantes obtenidos desde subproductos agroindustriales de tres fuentes (naranja, limón y ajonjolí) para evaluar su posible uso como compuestos activos de protección solar. Los liposomas con los compuestos activos fueron evaluados en su distribución de tamaño de partícula, el potencial Z, la morfología por microscopía de fluorescencia, así como la capacidad de actuar como un filtro ante los rayos UVB-UVA del sol. Los resultados mostraron que los liposomas tienen estabilidad y una morfología simétrica, así como también se determinó que algunos de los extractos encapsulados tienen la capacidad para actuar como un filtro de tipo físico contra la radiación solar (UVB-UVA).

Palabras clave: Nanoliposomas, Antioxidantes, Ultravioleta.

INTRODUCCIÓN

Dado al incremento del índice de radiación ultravioleta en los últimos años se ha detectado en todo el mundo un pronunciado incremento a la probabilidad de desarrollar algún tipo de cáncer de piel, no solo en las poblaciones de piel clara si no también en poblaciones de piel morena. El cáncer de piel es el más frecuente en los seres humanos, pues cada año se diagnostican dos millones de nuevos casos en todo el mundo. En México ocupa el primer lugar de incidencia entre los hombres y el tercero entre las mujeres [6].

Uno de los principales problemas para adquirir el cáncer de piel es la excesiva e inadecuada exposición solar durante tiempos prolongados sin el uso de protectores solares.

Medidas de prevención

La piel posee un mecanismo natural de defensa y adaptación hacia los rayos agresivos del sol, una de ellas, es la producción de melanina y la activación de moléculas antioxidantes. Este mecanismo de protección natural que tiene el cuerpo para soportar o bloquear los rayos del sol, algunas veces es ineficiente cuando el tiempo de exposición a la radiación es prolongada, por ello se propone la utilización de foto-protecciones artificiales como es el caso de los protectores solares. Una de las fuentes potenciales para el desarrollo de estos protectores solares son los subproductos agroindustriales los cuales contienen moléculas bioactivas con potencial fotoprotector.

Subproductos agroindustriales: cítricos y ajonjolí

Los subproductos agro-industriales de diversas fuentes son una fuente rica en compuestos bioactivos que pueden ser utilizados para el desarrollo de protectores solares. Entre ellos se encuentran los subproductos cítricos (naranja y limón) y los subproductos de ajonjolí.

Subproductos cítricos

La cáscara de los cítricos contiene una considerable cantidad de hesperidina, molécula que es una flavona glúcosida. La hesperidina es cuantitativamente el más importante de los flavonoides cítricos. Este flavonoide se encuentra principalmente en la parte blanca (flavedo) de la cáscara de cítricos.

El consumo de las cascaras de los cítricos reduce el riesgo de padecer cáncer de piel, los flavonoides cítricos más abundantes son los flavonas, especialmente los flavonas glicosiladas, y han sido bien estudiados por sus actividades biológicas anticancerígenas de la liberación de radicales libres y también por sus efectos antiinflamatorios para proteger contra enfermedades cardiovasculares o canceres [7].

Subproductos de ajonjolí

La torta de semillas de ajonjolí es el producto obtenido después de que el aceite se retira de ajonjolí, por lo general por prensado en frío. Los principales compuestos fenólicos que se encuentran en las semillas de ajonjolí son los lignanos, que son fisiológicamente activos y son compuestos funcionales importantes [3].

Adicionalmente se consideró el ácido ferúlico el cual es una molécula utilizada en la industria de la cosmetología debido a sus beneficios para la piel, algunos ejemplos de los tipos de cosméticos que contienen este ácido hidroxicinámico es en bloqueadores solares y de cosméticos que previenen la degradación por el sol.

A pesar de las múltiples propiedades de los flavonoides cítricos que los hacen fuertes candidatos para la prevención de enfermedades crónico-degenerativas sin embargo el uso de los flavonoides en varios dominios es limitado por su baja estabilidad y solubilidad en la fase aceite y la fase acuosa [1]. De ahí que es necesario recurrir a alternativas para incrementar sus propiedades de solubilidad y biodisponibilidad mediante el uso de la encapsulación en liposomas.

Los liposomas son vesículas huecas que encapsulan parte del disolvente en el que se han preparado, posee una membrana la cual puede estar formada por una o varias bicapas lipídicas, las cuales generalmente son de fosfolípidos.

Métodos de obtención de liposomas

Los métodos de preparación son seleccionados de acuerdo al tipo de liposoma y naturaleza de principio activo que se pretenden encapsular en el sistema [2].

El método de dispersión simple es uno de los métodos más conocidos y sencillos llevándose a cabo en una serie de pasos: Liofilización, hidratación de la bicapa lipídica y su dispersión y finalmente extrusión de fosfolípido [4]. Además del método de dispersión simple existen otros métodos para la formación de otros tipos de liposomas: sonicación, inyección, eliminación de detergente, extrusión, infusión con éter, evaporación en fase reversa, evaporación en fase inversa.

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluar diferentes moléculas con actividad antioxidante encapsuladas en liposomas de lecitina de soja.

Objetivos específicos.

1. Obtener extractos con actividad antioxidante de cascara de naranja, limón y torta de ajonjolí.
2. Encapsular y caracterizar los liposomas con los extractos.
3. Evaluar índice de radiación UVA Y UVC.

METODOLOGÍA

La metodología para el desarrollo del presente proyecto se describe a continuación:

Recolección de material cítrico

El material cítrico Naranja dulce (*Citrus aurantium)* y limón Mexicano (*Citrus aurantiifolia*) se compró en un supermercado en su temporada más abundante del año (Mayo de 2016). En el caso de la torta de ajonjolí fue proporcionada por la empresa líder SESAJAL, de una de sus líneas de proceso de obtención de aceite extra virgen de ajonjolí.

Elaboración de Extractos

Para la elaboración de los extractos limón, naranja y ajonjolí, se hizo de la siguiente manera. En el caso de los cítricos se extrajo la pulpa de ambos ya que para la elaboración del extracto solo se requiere la cascara de ambas frutas y en el caso de la torta de ajonjolí trituró en un mortero hasta que tuviera un aspecto homogéneo. La extracción con solvente se hizo por sonicación incubando a temperatura controlada bajo las siguientes condiciones (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de extracción solido-líquido

Relación solido solvente (50% agua, 50% Fenol)	1/3
Temperatura	50 °C
Tiempo	90 min

Una vez concluido el tiempo se retiraron los vasos de precipitado a un lugar donde se esperó a que su temperatura disminuyera, para ser filtrados para eliminar las cascaras y el ajonjolí quedando únicamente los extractos, después se movieron de lugar a un refrigerados de 3°C.

Los extractos obtenidos de limón, naranja y ajonjolí se les determinó su capacidad antioxidante a los diferentes extractos de cascara.

Formación de liposomas

La formación de liposomas se llevó a cabo mediante el método de Sonicación de Bangham el cual consiste en disolver la lecitina de soja en una mezcla de solventes orgánicos relación cloroformo: metanol (9:1 v/v). Se realizan tres soluciones de liposomas a una concentración de 1mM y 2mM, para un volumen de 3 ml de dispersión. Las dispersiones se mezclan mediante agitación mecánica (vortex) de la cual posteriormente se llevan a evaporar los solventes orgánicos con flujo de nitrógeno (N_2) gaseoso, para obtener como resultado una capa o película homogénea lipídica. Una vez de haberse asegurado que los viales donde se encuentran las películas no se encuentre ningún rastro de los solventes utilizados se recurre a agregar 1 ml de PBS (solución buffer fosfato salina), con un pH 7.4 y se lleva nuevamente a agitación mecánica (vortex) con esto se llevó a cabo la formación de vesículas multilamelares (MLV). Después la mezcla fue sometida al baño de Sonicación (sonicador Elmasonic P) para producir en los liposomas la reducción de tamaño , se realiza a una temperatura de 25°C durante un lapso de tiempo de 60 minutos con una frecuencia de 80Hz. Posteriormente se dejaron anillando en una hielera durante 1 hora [7]

Distribución de tamaño de partícula y Potencial Zeta

El determinación del tamaño de partícula y el potencial Z fueron determinados con el equipo nano Zeta Sizer.

Microscopía

Se utilizó microscopia por florescencia para visualizar la morfología de las nanoliposomas.
En la microscopia de esta alícuota, se tomaron 40µl de cada una de las muestras y fue observada con el objetivo de 40x. en algunos casos se requirió hacer diluciones.

Medición de Radiación UVA con Luxómetro

La medición radiación UVA consistió en aplicar 300 µl en una caja petri sin tapa, de cada una de las alícuotas que se encontraban en los viales falcón e iban a ser evaluadas posteriormente por medio del luxómetro a la exposición de una lámpara UV la cual mide radiaciones de UVA-UVC.
La exposición se llevo a cabo en dos fases:

1. Cuando la radiación emitida por la lámpara esta dispersa, se midió la radiación a cada uno de los liposomas con los diferentes compuestos ,con la finalidad de saber si tienen la característica ya sea, de absorber o repeler los rayos UVA del sol que son los mas peligrosos.
2. Encerrada en una sola dirección

se trato de manipular la radiación emitida por la lámpara en una sola dirección dirigida únicamente a la placa y al sensor del luxómetro.

RESULTADOS

Distribución de tamaño y Potencial Zeta

El tamaño de partícula fue medido con el Zeta Sizer, en los liposomas que previamente encapsularon ácido ferúlico, hesperidina y los tres extractos de cascara de naranja, limón y ajonjolí (Tabla 1).
En los resultados mostrados en la tabla 1 se muestran los tamaños de partícula que presenta que los liposomas tanto de los estándares como de los extractos.

Los estándares ácido ferúlico y hesperidina presentan tamaños promedio de 471 nm y 491 nm, con una dispersión del 80 % y 62.8 % respectivamente. En el caso de los extractos de limón y naranja su tamaño es de 698.4 nm y 771.4 nm con una dispersión 51.8% y 75.4%.

Particularmente el extracto de ajonjolí su pico mayoritario fue de 1917 nm con una dispersión del 48%, y su segundo pico en abundancia fue de 269.9 nm con una abundancia de 42.70%. En base a estas cifras mencionadas de acuerdo al tamaño nos permite confirmar que las liposomas generadas no presentan aglomeraciones.

Tabla 1. Distribución de tamaño de partícula y potencial Z de liposomas

Distribución de tamaño de partícula	**Estándares**		**Extractos**		
	Ácido ferúlico	**Hesperidina**	**Extracto limón**	**Extracto ajonjolí**	**Naranja**
Población 1	**471**	**491.2**	**698.4**	**1917**	**771.9**
Dispersión 1	80.20%	62.8%	51.80%	48%	75.40%
Población 2	**128.4**	**292.6**	**168.5**	**269.9**	**108.4**
Dispersión 2	19.80%	37.2%	48.20%	42.70%	24.50%
Población 3	**-**	**-**	**-**	**65.98**	
Dispersión 3	-	-	-	9.30%	

En cuanto a los parámetros de potencial Z y conductividad en general están dentro de los rangos lo que confirma la estabilidad de los liposomas.
Como ejemplo tenemos el ácido ferúlico cuyo potencial zeta fue de -31.1mV y una conductividad de 12.1 ms/cm, una ves analizando los resultados se confirmo que los liposomas se encuentran estables, y las cifras mencionadas de acuerdo al tamaño no presentan aglomeraciones en la sustancia (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de tamaño de partícula y potencial Z de los liposomas.

Parámetros	**Estándares**		**Extractos**		
	Ácido ferúlico	**Hesperidina**	**Extracto limón**	**Extracto ajonjolí**	**Naranja**
Potencial Z	-31.1 mv	-55.8 mv	-58.3 mv	-51.8 mv	-40.8 mv
Conductividad	12.1 ms/cm	1.61 ms/cm	1.76 ms/cm	1.68 ms/cm	1.72 ms/cm

Microscopía de florescencia
Liposomas de ácido ferúlico y hesperidina.
Se observaron los liposomas cargados con ácido ferúlico y hesperidina por microscopia epifluorescente. En el caso de los liposomas cargados con el ácido ferúlico (Fig. 1a) se observa de manera clara la formación de los liposomas de tamaños heterogéneos, pero mas pequeños que los que se observan en los liposomas cargados con hesperidina (Fig.1b). ambos liposomas cuentan con un halo claro lo cual indica que las moléculas de ácido ferúlico y hesperidina se concentran en la superficie debido sus propiedades de insolubilidad en agua.

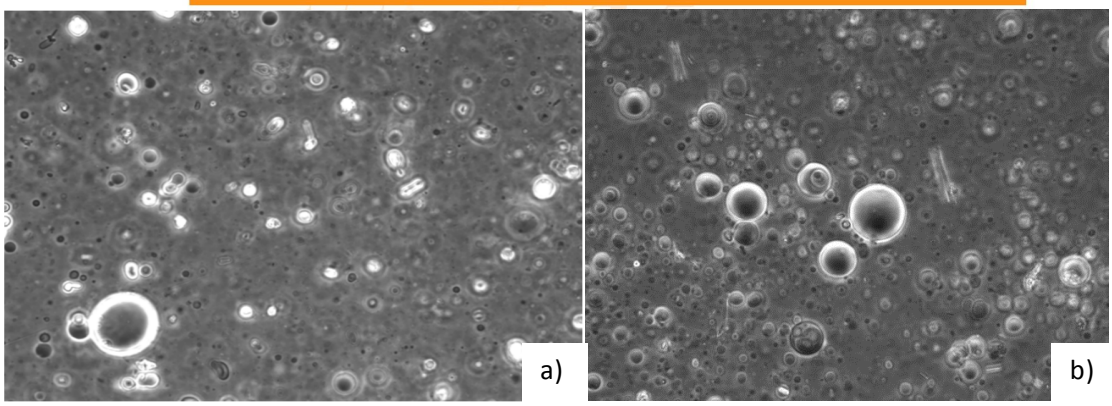


Figura 1. Micrografía de fluorescencia de liposomas cargados con a) Ácido ferúlico, b) Hesperidina. Liposomas de extractos de cascara de naranja, cáscara de limón

La formación de los liposomas con extracto de cascara de naranja (Fig. 2a) y con extracto de la cascara de limón (Fig. 2b) presentaron, al igual que los liposomas cargados con ácido ferúlico y hesperidina, buena morfología y una gran heterogeneidad de tamaño. Así como también puede observarse que la población de tamaños visibles en los liposomas cargados con extractos de críticos es mayor a las que se observan con los liposomas de la Figura 1.

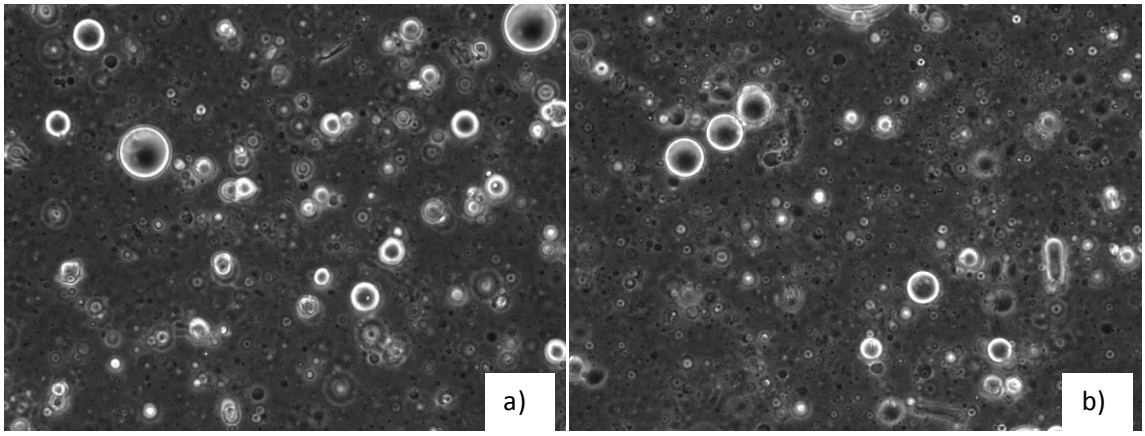


Figura 2. Micrografía de fluorescencia, de liposomas cargados con a) extracto de cascara de naranja, b) extracto de cáscara de limón.

Liposomas de extracto de ajonjolí

En el caso de las micrografías de los liposomas cargados con extracto de ajonjolí se pudieron observar una gran cantidad de tamaños de liposomas dentro de este análisis con una estructura esféricas muy simétricas, así como también estructuras amorfas (Fig. 3).

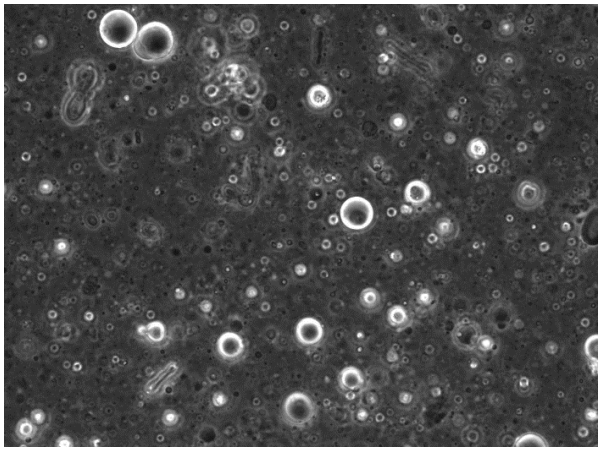


Figura 3. Micrografías de fluorescencia, de liposomas con extracto de ajonjolí.

Medición de Radiación UVA con Luxómetro

La inhibición de la radiación proyectada por la lámpara UV (UVA) los compuestos encapsulados que presentaron una mayor respuesta fueron los liposomas con extracto de ajonjolí, y los liposomas con hesperidina y ácido ferúlico. Dado que la radiación UVA no logro penetrar en su totalidad, como en el caso de los extractos de limón y de naranja (Figuras 4 y 5).

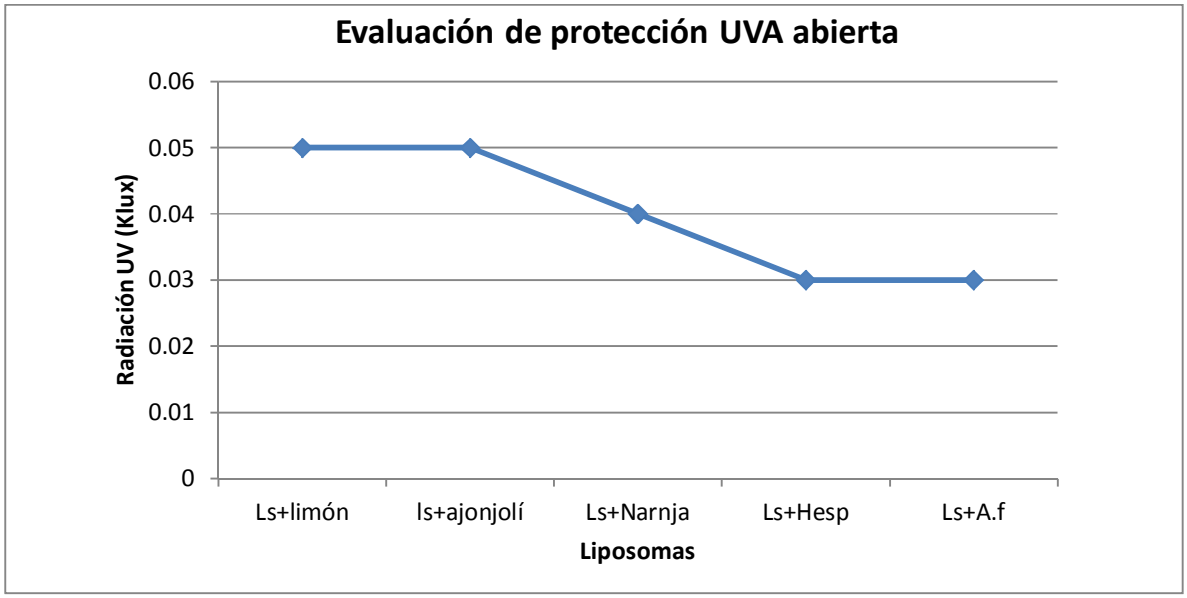


Figura 4. Exposición a radiación en lámpara UV (UVA) de los compuestos encapsulados mediante liposomas de lecitina de soja, en exposición dispersa.

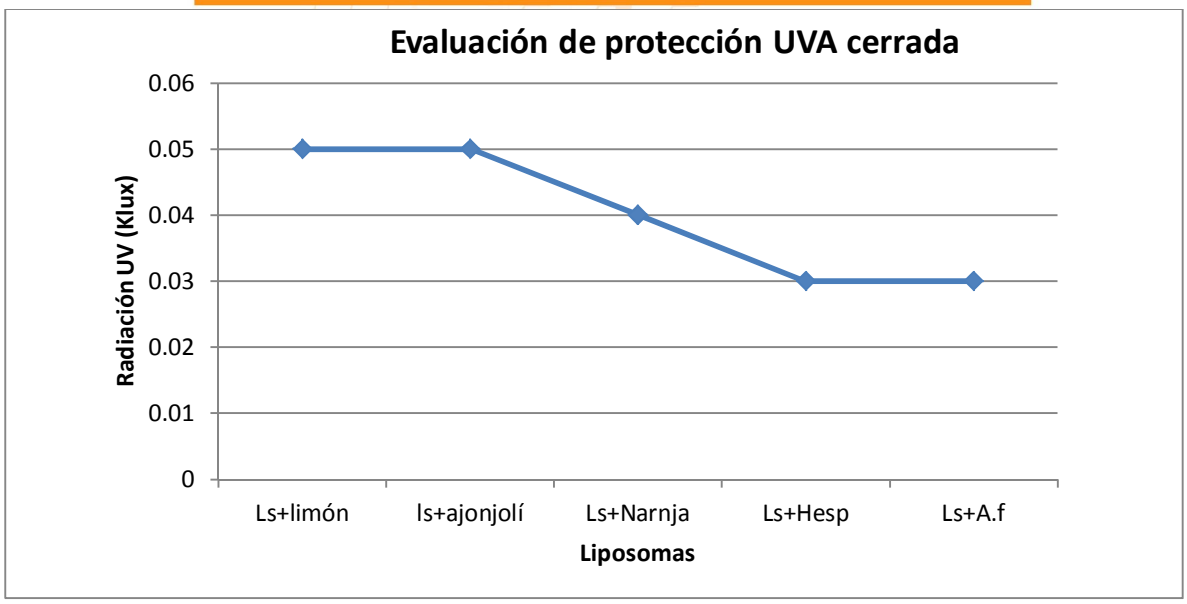


Figura 5. Exposición de los rayos UV(UVA), en encapsulamiento mediante liposomas de extractos antioxidantes, en exposición cerrada

CONCLUSIONES

1. En conclusión se observó que los extractos de la cascara de naranja, limón y ajonjolí presentan un alto contenido en antioxidantes (flavonoides), de acuerdo a la prueba de capacidad antioxidante DPPH presentando características de biocompatibilidad con vesículas lipídicas (liposomas).
2. El método recomendado para la formación de liposomas adicionados con ácido ferúlico, hesperidina y los extractos antioxidantes, es mediante la sonicación de lípidos y extractos.
3. Los liposomas presentaron formas muy simétricas, esto demostró que aunque los compuestos adicionados fueran de pH ácido no interfirió en su incorporación con las vesículas lipídica, ni alteran su forma o morfología como se tenía pensado, así como su estabilidad presentada por los resultados del potencial-zeta demostró una estabilidad de cada uno de los compuestos ya encapsulados.
4. Al realizar las pruebas de radiación a los encapsulamientos se demostró que los compuestos en donde fueron encapsulados ácido ferúlico, hesperidina, y extracto de ajonjolí tienen la capacidad para actuar como un filtro de tipo físico ante la radiación UVA ya que en los rangos bajo hasta 0.02 Klux en cada prueba a una exposición prolongada de 10 min sin interrupciones.

REFERENCIAS

[1] Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.M., Ghoul, M. (2006) Enzymatic acylation of flavonoids Process Biochemistry, 41 (11): 2237-2251.
[2] Clares, B.:Tesis doctoral. Sistemas de Transporte y Liberación de Fármacos de Aplicación Tópica: Liposomas multilamilares portadores de Acetonido de Triamcinolona. Universidad de Granada, España 2003.
[3] Dar AA, Arumugam N. (2013) Bioorg Chem. 2013 Oct;50:1-10. doi: 10.1016/j.bioorg.2013.06.009. Epub 2013 Jul 19.
[4] Jones, M. & Chapman, D. (1995). Micelles, monolayers, and biomembranes. New York: Wiley-Liss.

[5] Magaña, R. S. (18 de 02 de 2014). El financiero. Cáncer de piel, segundo lugar de incidencia en México: FMD: http://www.elfinanciero.com.mx/sociedad/cancer-de-piel-segundo-lugar-de incidencia-en-mexico-fmd.html.

[6] Iman A. Hakim, Robin B. Harris & Cheryl Ritenbaugh (2000) Citrus Peel Use Is Associated With Reduced Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Skin, Nutrition and Cancer, 37:2, 161-168, DOI: 10.1207/S15327914NC372_7.

[7] Vallejo, A. and Fernández, M..,2007. Archives of Biochemistry and Biophysics 466 (2007) 145–154.

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE LIXIVIACIÓN DE CAPSAICINOIDES DE CHILE HABANERO MEDIANTE ACEITES VEGETALES.

[1*]Torres-Castro, G.M., [2]López-Ramírez, J.E. y [2]Castillo-Herrera, G.A.

1. Universidad Autónoma de Guadalajara, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Patria 1201, Col. Lomas de Valle, C.P. 45129, Zapopan, Jalisco, México.
2. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) , Tecnología Alimentaria, Camino Arenero 1227, El Bajío del arenal, CP. 45019 Zapopan, Jalisco, México

*Autor para correspondencia: iq.michelle.tca@hotmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN

El chile habanero es un cultivo originario de México considerado como uno de los de mayor pungencia en el mundo, su contenido de capsaicina es entre las 200,000 y 500,000 Unidades Scoville [1]. La capsaicina es el principal componente activo responsable de la sensación de picor, e incluso dolor en la mucosa oral [2]. El interés por este compuesto no es sólo debido a su aplicación en la industria alimentaria, se extiende a la industria química para la elaboración de pinturas, barnices y gases lacrimógenos y a la industria médica por sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Actualmente los procedimientos mediante los cuales es posible obtener extractos naturales de capsaicina es mediante extracción con solventes orgánicos y extracción con dióxido de carbono supercrítico, sin embargo, estas tecnologías requiere del manejo de compuestos volátiles e inflamables y operaciones a temperaturas y presiones elevadas. Esta investigación tiene como objetivo determinar las condiciones de tiempo, temperatura y relación solvente: sólido para la extracción de capsaicinoides a partir de chile habanero, utilizando un proceso de lixiviación emplenado como solvente aceite vegetales debido a su alta disponibilidad, bajo costo y libre de residuos tóxicos. Se evaluaron diferentes tiempos de extracción, temperaturas y relaciones solvente: sólido, usando un tanque agitado con calentamiento a nivel laboratorio y un diseño experimental evaluando el efecto de dos factores en dos niveles, sobre el contenido de capsaiciones totales, además se experimentaron con puntos centrales. Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia dando como resultado que los parámetros óptimos de extracción de capsaicinoides es un tiempo de 8 horas, una relación (aceite/chile) de 5:1 y una temperatura de 60ºC.

Palabras clave: Capsaicina; Capsaicinoides; Chile habanero; Lixiviación; Aceite vegetal.

REFERENCIAS

[1] Castañón Nájera G, L. Latournerie Moreno, M. Mendoza Elos, A. Vargas López & H. Cárdenas Morales (2008). Sampling and characterization of pepper chilli (Capsicum spp) in Tabasco, México. International Journal of EXPERIMENTAL BOTANY. Tabasco, México.

[2] Brian Rohring . (2014). Chili picante: Muy picante!. Junio 2016, de American Chemistry Society Sitio web:

https://www.acs.org/content/dam/acsorg/education/resources/highschool/chemmatters/spanishtranslations/chemmatters-dec2013.pdf

DETERMINACION DE LA REDUCCIÓN DE Fe +3 Y LA GENERACIÓN DE ENERGÍA POR UN CONSORCIO ENRIQUECIDO DEL EFLUENTE DE UN PROCESO SULFUROGÉNICO.

Becerril-Varela, K., Serment-Guerrero, J.H., Monterrubio-Badillo, Ma., Bremauntz-Michavila, P. y *Guerrero-Barajas, C.

1 Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-IPN. Centro Mexicano para la Producción Más Limpia-IPN. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

*Autor para correspondencia: cguerrerobarajas@gmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN
Actualmente se buscan nuevas alternativas para mejorar la calidad de vida en los países donde el desarrollo industrial ha causado estragos en el medio ambiente. Como se sabe, la creciente demanda de energía en el mundo y el uso excesivo de combustibles fósiles han provocado serios problemas de contaminación ambiental y el calentamiento global de la tierra. La biorremediación por ejemplo, se convierte en una opción viable para el tratamiento de suelos y aguas que hayan sido contaminados principalmente por compuestos orgánicos e inorgánicos derivados de actividades humanas. Se busca explorar el uso de microorganismos como son las bacterias para diversos fines, entre ellos el mejoramiento del medio ambiente, pues los microorganismos desde su origen han desempeñado un papel importante que han dado lugar al desarrollo del planeta. Las celdas de energía microbiana (CEM) ofrecen la posibilidad de convertir compuestos orgánicos en electricidad mediante el metabolismo de dichos microorganismos y los diferentes iones que son liberados hacia el medio extracelular. Se conocen ya varios microorganismos con la capacidad de liberar electrones a través de la degradación de materia orgánica. Es por eso que las CEM's son una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales que si bien representan un desafío tecnológico, por el reemplazo de sistemas convencionales a este tipo de sistemas bioelectrogénicos. El objetivo del presente trabajo es evaluar la eficiencia en la reducción de Fe+3 y generación de energía en una CEM utilizando como fuente de microorganismos un efluente de un reactor UASB sulfurogénico. La comunidad microbiana se ha cultivado con acetato como fuente de carbono y Fe+3 de acuerdo a la estequiometría de la reacción de reducción de Fe+3. Las CEM's están construida de acrílico en sus dos cámaras, una que funciona como ánodo y otra como cátodo, separadas por una membrana de intercambio protónico y conectadas entre sí mediante un circuito eléctrico. En la cámara del ánodo se colocó medio de cultivo y se inoculó con las bacterias provenientes del efluente de un reactor sulfurogénico. En la cámara catódica se vertió agua destilada. Como electrodos se utilizó tela de grafito acoplada a una varilla de acero inoxidable. El trabajo presentará resultados sobre la reducción de Fe+3. Se discutirá el carácter electrogénico de los microorganismos en el sistema. Se presentarán los resultados sobre experimentos de voltametría cíclica y generación de voltaje a circuito abierto del sistema a las diferentes condiciones experimentales.

Palabras clave: CEM; Energía; Consorcios electrogénicos.

REFERENCIAS

[1] Falcón A., Lozano E. y Juárez K. "Bioelectricidad". Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, México. BioTecnología, Vol. 13: 62-78. 2009

[2] 2. Rabaey, K. y Verstraete, W. "Microbial Fuel Cells Novel biotechnology for energy generation". Advanced Water Management Centre, The University of Queensland, Brisbane, Australia Trends Biotechnology. Vol 23: 291-298. 2003

[3] 3. Wang, De Bin et al. "Electricity Generation from Sediment Microbial International Journal of Hydrogen Energy" Laboratory of Materials-oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University.China. Vol 39: 13224–1330. 2014

DEGRADACIÓN DE BOTELLAS DE POLI (ETILEN TEREFTALATO) (PET).

*Espinoza-García, K., Ramírez-Hernández, A. y Marcos-Fernández, A.

Universidad del Papaloapan. Circuito central #200, Colonia Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oaxaca, México. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP-CSIC). Calle Juan de la Cierva, 3, C.P. 28006, Madrid, España.

*Autor para correspondencia: kari_quimica@hotmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN

En la actualidad el consumo de los plásticos a nivel mundial, tanto en los hogares como en las industrias, es muy elevado; pero también es elevado el desecho de estos plásticos en depósitos o vertederos ilegales (calles o baldíos) después de su uso, convirtiéndose en un problema de contaminación ambiental. Uno de los plásticos contaminantes es el poli (etilen tereftalato) (PET), el cual presenta resistencia a degradarse de manera física, química y naturalmente. Por tal razón, se investigan rutas de degradación alternativas del PET que mejoren las condiciones que ya se tienen reportadas. En este trabajo se estudió la degradación del PET con etilen carbonato e hidróxido de potasio a una temperatura de 130°C y variando el tiempo. Los productos de reacción se caracterizaron por viscosímetria y RMN de protón y carbono 13. Se determinó que el producto de la degradación del PET fueron oligómeros de masa molar pequeña. Estos oligómeros tienen un alto potencial para la síntesis de materiales biodegradables.

Palabras clave: Plásticos; PET; Degradación; Oligómeros.

REFERENCIAS

[1] Saeid H.S., Taheri S., Zadhoush A., Mehrabani-Zeinabad A. Hydrolytic degradation of poly(ethylene terephthalate). J. Appl Polym. Sci. 2005. 103:2304-2309

[2] Genta M., Iwaya T., Sasaki M., Goto M., Hirose T. Depolymerization mechanism of poly(ethylene terephthalate) in suoercritical methanol. Ind. Eng.

[3] Chem Res. 2005. 44:3894-3900 Chih-Yu K., Benz-Zu W., Wu-Hsun C. Kinetics of hydrolytic depolimerization of melt poly(ethylene terephthalate). Eng. Chem. Res. 1998. 37:1228-1234

REMOCIÓN DE LA CIPROFLOXACINA PRESENTE EN AGUAS SINTETICAS EMPLEANDO DIATOMITA COMO ADSORBENTE NATURAL.

[1]del-Real-Olvera, J., [1]García-Alonso, A., [2]Sulbaran-Rangel, B.C. y [2]Guzmán-González, C.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C)
2. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Tonala. (CuTonala)

*Autor para correspondencia: jdelreal@ciatej.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química.

RESUMEN

La diatomita es una roca de origen sedimentario y su composición silícea amorfa Consiste principalmente de restos de esqueletos fosilizados de diatomeas. Las diatomeas son plantas unicelulares acuáticas relacionadas con las algas. Estas son rocas silíceas (sílice amorfa, ópalo, inerte y de baja toxicidad) [1]. Se clasifican como minerales de origen orgánico. La sílice ésta presenta pequeñas cantidades de componentes inorgánicos asociados, tales como aluminio, hierro, amonio, metales alcalinos y otros constituyentes menores [2]. En este proyecto se analiza la factibilidad de emplear diatomita natural para llevar acabo la remoción de ciprofloxacina presente en aguas sintéticas en un sistema de prueba de jarras. Para lograr lo anterior, se prepararon muestras sintéticas de agua con ciprofloxacina a concentraciones de 5 a 40 mg/L y diferentes pH (2, 6 y 10), empleando diversas concentraciones de zeolita con tamaño promedio de partícula de 0.5 mm (0.5, 1 y 1.5 g) sin y con tratamiento térmico (550 y 900 °C) por 12 horas. Los resultados preliminares indican que 1 gramo de zeolita sin tratamiento térmico presenta una mayor capacidad de adsorción de la ciprofloxacina presente en el medio (40% a pH de 10 y 47% a pH 2) en comparación con la misma cantidad de zeolita tratada térmicamente a 550 °C (21% a pH de 10 y17% a pH de 2). Se pudo comprobar que los fenómenos de transporte de masa sólido-líquido son cruciales para obtener una mayor eficiencia de remoción, pues al incrementar la velocidad de agitación se aumenta la eficiencia del sistema de adsorción. Con los resultados obtenidos se puede concluir que la diatomita sin tratamiento térmico ofrece un mejor porcentaje de remoción, esto debido probablemente a la modificación de la carga iónica al aplicar altas temperaturas al material, además los incrementos en la velocidad de agitación han arrojado resultados significativamente mejores, cuando se comparan con los resultados obtenidos con la zeolita tratada a 550°C y bajas revoluciones [3]. El pH es otro de los factores importante en el tratamiento pues al manejar el sistema en la parte ácida se obtiene mejor remoción de ciprofloxacina, esto es notorio en las curvas de absorción debido a la deformación de la curva del ciprofloxacina.

Palabras clave: Aguas residuales; ciprofloxacina; zeolitas; adsorción.

REFERENCIAS

[1] Escalante, V., et al., El rehusó del agua residual tratada en México. Seminario Internacional sobre Métodos Naturales para el Tratamiento de Aguas Residuales, 2003: p. 230-236.

[2] Condori, S.B., NANOFILTROS: Nanotecnología para solucionar el problema del agua. Revista de Información, Tecnología y Sociedad, 2010: p. 84.

[3] Hernández-Ávila, J., Salinas-Rodríguez, E., Cerecedo-Sáenz, E., Reyes-Valderrama, M. I., Arenas-Flores, A., Román-Gutiérrez, A. D., & Rodríguez-Lugo, V. (2017). Diatoms and Their Capability for Heavy Metals Removal by Cationic Exchange.

SÍNTESIS DE HDLs DE Zn-Al, Co-Al, Cu-Al y Ni-Al COMO SOPORTES PARA INMOVILIZACIÓN POR AFINIDAD.

Venegas-Reynoso, A., Carbajal-Arízaga, G.G., y *Velázquez-Juárez, G.

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Departamento de Química, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, CP 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: gilvelazquez83@gmail.com

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

Los hidróxidos dobles laminares son arcillas sintéticas conocidas por su capacidad para intercalar iones y moléculas orgánicas en su interior, sin embargo, su capacidad para inmovilizar proteínas por afinidad en su superficie no ha sido estudiada. Se sintetizaron los hidróxidos dobles laminares de los cationes divalentes Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} y Mg^{2+} junto con el catión trivalente Al^{3+} por el método de co-precipitación a un pH de 8, en una proporción molar 2.5:1, respectivamente. En el caso del Cu^{2+}-Al^{3+} se realizó el mismo método pero incorporando NaCl en una proporción molar 1:2:1 (Cu^{2+}-Al^{3+}-Na^{+}) y titulando hasta pH 10.7 con una solución de NaOH 1 M. La caracterización de estas arcillas se realizó por difracción de rayos X de polvos, obteniéndose un patrón de difracción característico de los hidróxidos dobles laminares, de alta cristalinidad pero calidad de apilamiento de láminas variable. Las pruebas de inmovilización se hicieron pesando 0.05 g de los hidróxidos dobles laminares previamente sintetizados y enzima a una concentración de 0.26 mg/ml, las muestras fueron centrifugadas y guardadas para análisis por electroforesis de proteína desnaturalizante (SDS-PAGE) en un gel al 12%. Los geles fueron teñidos con azul de comassie y el contraste se realizó con soluciones de acético metanol, para observar las bandas correspondientes.

Palabras clave: Hidróxido dobles laminares;inmovilización por afinidad; polihistidina.

INTRODUCCIÓN

El proceso de inmovilización consiste en restringir la movilidad espacial de una molécula artificialmente [1]. En la actualidad se prefiere trabajar con enzimas inmovilizadas debido al aumento de su vida de almacén, reusabilidad, aumento de estabilidad estructural y facilidad de purificación[2].

Los métodos para inmovilizar una enzima pueden clasificarse en tres tipos: atrapamiento, enlace cruzado entre moléculas (cross-linking) y unión a un portador (binding).

El método de atrapamiento puede realizarse por gel, microencapsulación o en fibras, tiene como ventaja su simplicidad, sin embargo pueden presentarse fugas y está limitado por el transporte de masa. El enlace cruzado entre moléculas utiliza compuestos multifuncionales para unir las enzimas deseadas, pero presenta una baja reproducibilidad.

Por otra parte, la unión a un portador o binding puede realizarse por interacciones covalentes, adsorción física, interacciones iónicas o por afinidad; la fuerza de la unión soporte-enzima varía dependiendo de la técnica, presentando diversas ventajas y desventajas [1].

Una forma de realizar inmovilización por afinidad consiste en añadir seis residuos de histidina en los átomos de N o C de la cadena de aminoácidos, lo cual no suele intervenir con la actividad de la proteína, sin embargo esta cantidad de residuos puede ser diferente; más corta en caso de que la etiqueta modifique la estructura de la proteína o más larga cuando sea necesario aplicar lavados más rigurosos [3].

Los hidróxidos dobles laminares (HDL) son materiales con estructura cristalina hexagonal de fórmula: $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_{x}(OH)_2]^{x+}[(A^{n-})_{x/n}\cdot mH_2O]^{x-}$

donde A^{n-} son los aniones intercalados en la estructura y M^{2+} y M^{3+} son los cationes divalentes y trivalentes respectivamente [4].

El interés en estos materiales radica en su capacidad para intercambiar aniones entre sus capas, su biocompatibilidad, habilidad para transportar biomoléculas en su interior y bajo costo [4], sin embargo su capacidad como matriz para inmovilizar proteínas por afinidad no ha sido estudiada.

El presente proyecto tiene como objetivo la síntesis de los HDL de los cationes divalentes Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} y Zn^{2+} y el catión trivalente Al^{3+} así como la evaluación de la capacidad de enlace de proteínas a estos soportes y de la actividad enzimática remanente en catálisis heterogénea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos para la síntesis de HDL

Cloruro de níquel (II) ($NiCl_2\cdot6H_2O$), cloruro de cobalto (II) ($CoCl_2\cdot6H_2O$), cloruro de cobre (II) ($CuCl_2\cdot2H_2O$), cloruro de zinc ($ZnCl_2\cdot6H_2O$), cloruro de magnesio ($MgCl_2\cdot6H_2O$), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de alumunio ($AlCl_3\cdot6H_2O$), hidróxido de sodio (NaOH) y agua bidestilada.

Síntesis de HDL

La preparación de las arcillas se realizó por el método de co-precipitación. Para los casos de los cationes divalentes: Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+} se pesaron las sales correspondientes para tener una proporción molar 2.5:1 con respecto al catión Al^{3+}. Se procedió a disolver las sales en 10 ml de agua y a titular con una solución de NaOH 1 M hasta pH 8.0, se mantuvo en agitación durante 24 horas y se realizaron lavados para eliminar las sales solubles y llevar la muestra a pH 7. Durante la síntesis del HDL con Co^{2+}, se mantuvo un bombeo constante de N_2 para evitar la oxidación de este catión.

Para el HDL de Cu^{2+} se utilizó $CuCl_2$, $AlCl_3$ y NaCl en proporciones molares 2:1:2 respectivamente y se realizó la titulación hasta pH 10.7 [5] el resto de la síntesis se realizó de la misma manera a la reportada anteriormente.

Las arcillas obtenidas fueron caracterizadas por difracción de rayos X de polvos.

Inmovilización de la enzima

Para la inmovilización de la enzima 0.05 g de los HDL fueron pesados, una solución de tampón de fosfato salino se utilizó para lavar la resina, para la posterior incubación con enzima a concentración de 0.26 mg/mL con agitación en orbital a (200 rpm), a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se guardó a temperatura de 4 °C para su posterior análisis por electroforesis.

Electroforesis de proteínas

Para evaluar la fijación de la enzima a la resina se utilizó la técnica de electroforesis de proteína desnaturalizante (SDS-PAGE) en un gel al 12%. Las muestras de los sobrenadantes después de la inmovilización se colocaron con buffer de Laemmli 5X, y las muestras fueron corridas a 120 Volts en una cámara de electroforesis vertical. Los geles fueron teñidos con azul de comassie y el contraste se realizó con soluciones de acético metanol, para observar las bandas correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Difractogramas de rayos X

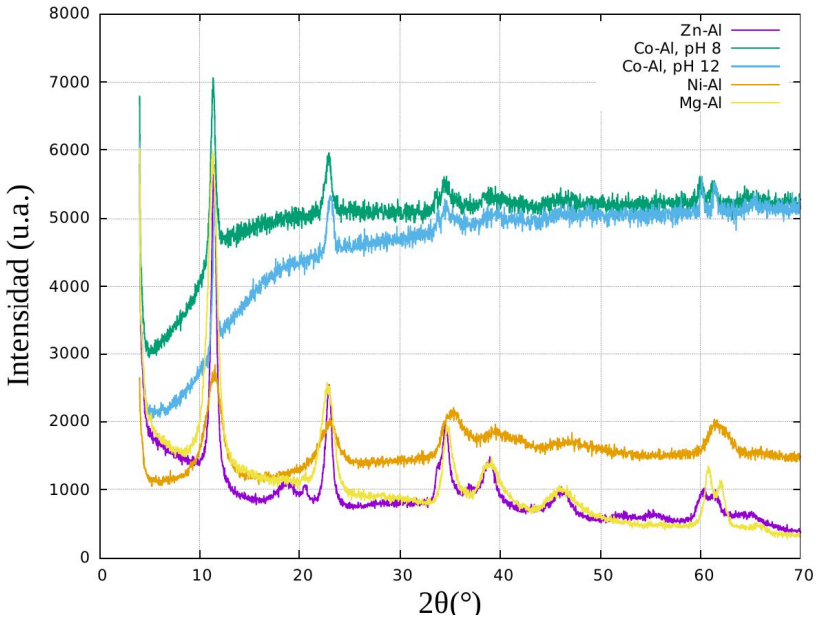


Fig. 1: Difractogramas de rayos X de HDL.

En la figura 1 puede observarse alrededor de los 4 grados 2q la reflexión basal, que es la distancia entre dos láminas contiguas; cuando los HDL presentan altos grados de cristalinidad, es posible observar reflexiones armónicas como las presentes en los 8 y 24 grados 2q.

La reflexión alrededor de los 35 grados 2q representa la calidad de apilamiento de las láminas, además en caso de que el HDL presente alta cristalinidad, pueden presentarse una o dos reflexiones arriba de los 60 grados 2q, que equivalen a la distancia entre los cationes dentro de las láminas [6].

CONCLUSIONES

Se sintetizaron las arcillas correspondientes a los cationes divalentes Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} y Mg^{2+} y el catión trivalente Al^{3+}, sirviendo el magnesio un control para verificar si el tipo de unión entre arcilla y enzima era por afinidad.

La caracterización de estos materiales muestra un perfil típico de los hidróxidos dobles laminares, con alto grado de cristalinidad y calidad de apilamiento variable entre muestras. Es necesario realizar una caracterización por IR para observar cuál es el anión intercalado entre estas láminas o si se presenta una combinación entre cloruros y carbonatos.
Aún no se tienen los resultados de las pruebas de inmovilización realizadas por electroforesis de proteína desnaturalizante, sin embargo se espera reportarlos próximamente.

REFERENCIAS

[1] E. Benešová and B. Králová, "Affinity Interactions as a Tool for Protein Immobilization," *Affin. Chromatogr.*, pp. 29–46, 2012.
[2] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2013.
[3] B. J. A. Bornhorst and J. J. Falke, "Reprint of: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags," *Protein Expr. Purif.*, vol. 326, no. 1992, pp. 245–254, 2000.
[4] N. Aware, Kadam, Hirlekar, "Layered double hydroxides : A review," vol. 68, no. May 2009, pp. 267–272, 2016.
[5] S. Chakraborty, I. Sarkar, K. Haldar, S. K. Pal, and S. Chakraborty, "Synthesis of Cu-Al layered double hydroxide nanofluid and characterization of its thermal properties," *Appl. Clay Sci.*, vol. 107, pp. 98–108, 2015.
[6] D. R. Martínez and G. G. Carbajal, "Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología," vol. 7, no. 1, pp. 87–99, 2012.

FORMULACIÓN DE UN SISTEMA DE RESINA EPOXICA DE DOBLE CURADO PARA LA PREPARACIÓN DE UN PREIMPREGNADO ESTABLE A TEMPERATURA AMBIENTE.

[1]Sánchez-R., O.A.; [2]Ibarra-W., R.; [1]Herrera-L, T.E.

1. Universidad Autónoma de Guadalajara / Av. Patria 1201, Lomas del Valle.
2. Cima de BC, SA de CV.

*Autor para correspondencia: therrera@edu.uag.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN

El preimpregnado o prepreg, es un material que se puede presentar bajo distintas formas, laminas, tejido unidireccional, roving, etc., que ha sido impregnado con algún tipo de resina previo a su uso y son almacenados generalmente a bajas temperaturas (-20°C). La característica principal de este tipo de materiales es que la resina que los componen se haya en un estado de semicurado, estado "B", lo que confiere un tacto pegajoso, denominado "tacking". El objetivo de este trabajo es crear un material preimpregnado estable a temperatura ambiente, con un sistema de resina epoxica multicomponente. La formulación de la resina de doble curado pretende mejorar la estabilidad de la resina epoxica del material compuesto sin la necesidad de mantenerla almacenada a bajas temperaturas, y sin afectar las condiciones de manejo de la resina original. En este trabajo se evaluó la estabibilidad del prepreg a temperatura ambiente en función del tack y también se evaluaron propiedades mecánicas del material preimpregnado una vez curado.

Palabras clave: Resina epoxica; prepreg; tack.

INTRODUCCIÓN

Un material preimpregnado o prepreg consiste en una fibra tejida impregnada con una resina que contiene un endurecedor de forma latente.[1] Habrá que tomar en cuenta que incluso en las resinas menos reactivas, la reacción no está paralizada aunque se mantenga a bajas temperaturas, de modo que hay que saber que, desde el momento en que los distintos componentes de la resina han sido mezclados para la impregnación, estamos hablando de un estado dinámico, que avanza en el tiempo a una mayor o menor velocidad, en función de su reactividad y de la temperatura.[2]

De esta manera se puede controlar el entrecruzamiento de la resina por medio de la temperatura o incorporando algún promotor. La viscosidad de la resina es ajustada para dar al prepreg el tack apropiado, esto se logra por la adición de polímeros termoplásticos o por "avance" de la resina con la reacción parcial con el endurecedor. [1]

Las ventajas de este tipo de material son varias. En primer lugar el control sobre fibra/resina está muy determinado, y además es muy alto, lo que hace que sea ampliamente utilizado para la fabricación de piezas estructurales en la industria aeronáutica, energía eólica, productos de alta competición deportiva, etc. En segundo lugar, el hecho de que el material contenga la resina a priori, elimina la necesidad de

impregnarla in situ, con lo que el proceso de laminado de la pieza se simplifica considerablemente, reduciendo en gran manera los posibles defectos de fabricación de la misma. Sin embargo la desventaja principal de este tipo de materiales es el elevado costo de almacenamiento debido a la necesidad de mantener este material bajo refrigeración, de igual forma si el material no es llevado a temperatura ambiente de la manera correcta se pueden arruinar sus propiedades.[3]

Para resolver este problema en 1986 se propone patente US 4,607,069 un sistema de resina heterogéneo libre de solvente estable a temperatura ambiente durante 60 días, esto se logró mediante la combinación de la resina epoxica DGBA y como iniciador la 4,4-Diaminodifenil Cetona en tamaños menores a los 5µm; la estabilidad a temperatura ambiente de este sistema se debe a que el iniciador no es soluble en la resina a temperatura ambiente por lo cual el sistema no reacciona, sin embargo las condiciones para impregnar la fibra son poco convencionales ya que para poder impregnar la fibra hay que calentar la resina a 70°C y las condiciones de curado que se reportan de un pre-curado a 140°C a 15 bar durante 2 horas para después curar el preimpregnado a 180°C durante 6 horas.[4]

En 1993 Qureshi et al. proponen en su patente un sistema heterogéneo de resina estable a temperatura ambiente; en el que se utiliza un iniciador solido 3-3'-diaminodifenilsulfona que una vez disperso en la resina epoxica N,N,N',N'-tetraglicidil-bis(4-amino-3-etilfenil)metano reporta un sistema estable a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, sin embargo la resina utilizada en esta patente es muy poco convencional en comparación con la resina de DGEBA que se utilizó en este trabajo. [5]

En este trabajo se propone la formulación de un sistema de resina para preimpregnado que sea estable a temperatura ambiente y con un ciclo de curado corto. El sistema de resina propuesto consiste de dos partes, el primer componente consiste en una resina de curado rápido del ya conocido sistema de Bisfenol-A con su iniciador que en este caso utilizamos una tetra amina alifática el inconveniente de este sistema es que su reactividad es muy elevada por lo que la resina cura por completo a temperatura ambiente, por lo cual se propuso la incorporación de un segundo componente una resina de di-acrilato de Bisfenol-A que a diferencia de la resina epoxica este polimeriza por radiación UV o por temperaturas mayores a los 100°C y no por iniciador, lo cual asegura la estabilidad de esta resina a temperatura ambiente.

Para poder evaluar nuestro preimpregnado se hicieron variar las concentraciones del sistema de resina; para de esta forma averiguar cuál es la formulación optima tomando como variables de respuesta el tack, la resistencia a la flexión. Los resultados provenientes de las pruebas de tack son los que nos darán idea de la estabilidad del sistema de resina a temperatura ambiente que es el objetivo principal del proyecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prepreg

El prepreg fibra de carbono/epoxy se realizó a diferentes niveles concentración de la resina epoxica DGEBA (RE-7000-1 HIMSA) premezclado con un 1/7 de trietilentetramina (HD-307 HIMSA) como iniciador en relación al contenido de DGEBA, un 10% de tripropilenglicol diacrilato (CMP) que actúa como diluyente y entrecruzante y el porcentaje restante con la resina de epoxi acrilato (CMP). El contenido de la fibra en el preimpregnado fue de 55 ± 5%. Para la impregnación de la fibra se hizo variar

el contenido de DGEBA entre 20% y 30%; como se lista en la Tabla 1. Para el curado del preimpregnado se utilizó un horno de vacío (Shel Lab) a 130°C durante 1:40:00 h. Al preimpregndo obtenido se evaluó en que porcentajes de DGEBA provee los valores óptimos en resistencia a la flexión y tack.

Tabla 1 Contenido de DGEBA en preimpregnados

Número de prepreg	Contenido de DGEBA
1	20%
2	22.5%
3	25%
4	27.5%
5	30%

Prueba de tack

En la actualidad no hay una prueba que determine el tack de un material preimpregnado; sin embargo este se le puede relacionar con algunas otras propiedades de materiales adhesivos como lo es la prueba de resistencia al decapado de materiales adhesivos o "Peel" la cual se describe en la norma ASTM D 903-98. Un esquema de la prueba de decapado se muestra en la Fig. 1. Se hacen tiras de preimpregnado que miden 305 mm de largo por 25 mm de ancho, estas se adhieren a una superficie metálica y se realiza un doblez a una dirección de 270°. La prueba de tack se realizó a temperatura ambiente y se midió la fuerza requerida para decaparlo de la superficie metálica. Las pruebas se realizaron en una maquina universal.

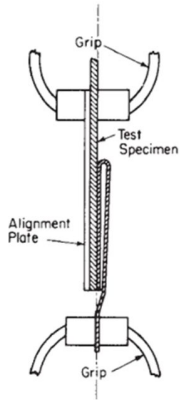


Figura 1. Esquema de la prueba ASTM D903-98 método utilizado en la determinación del tack de los preimpregnados.

Prueba de resistencia a la flexión

Se realiza la prueba de resistencia a la flexión del material preimpregnado para determinar si las propiedades mecánicas de la resina epoxica cambian por la incorporación de epoxi acrilato o se mantienen. Para la prueba de la resistencia a la flexión de los preimpregnados se evaluaron los prepregs con diferentes concentraciones de resina por medio de la prueba ASTM D790 el cual es esquematizado en la Fig. 2. En esta prueba el prepreg curado de sección rectangular (8cm x 3cm) es sometido a una carga en tres puntos. El máximo estrés antes del fallo a la tensión de un espécimen flexible es considerado como la fuerza de flexión del material. La fuerza de flexión en una prueba de tres puntos viene dada por:

$$\sigma_{iF} = \frac{3P_{\max}L}{2bh^2}$$

Donde:

Pmax= Maxima carga a la falla
b=ancho del espécimen
h=calibre del espécimen
L= ancho del espécimen entre dos puntos de apoyo.

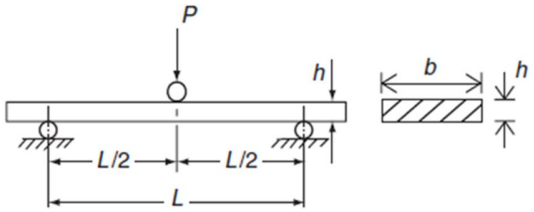


Figura 2. Esquema de la prueba ASTM D790 para la resistencia a la flexión del preimpregnado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Estabilidad de la fuerza de tack en los preimpregnados

El tack es una propiedad importante de estos materiales ya que determina la habilidad de los prepregs de adherirse entre sí o a un molde, esto se puede relacionar con el nivel de curado del material, ya que cuando este cura por completo pierde la propiedad de adherirse o de tack.

Para obtener resultados del tiempo de tack de nuestras fibras preimpregnadas se relacionaron las pruebas de peeling según la norma ASTM D-903 contra el tiempo y se observó como la fuerza de "peel" fue variando a través del tiempo y según el tipo de resina con la que se impregnaron nuestras fibras.

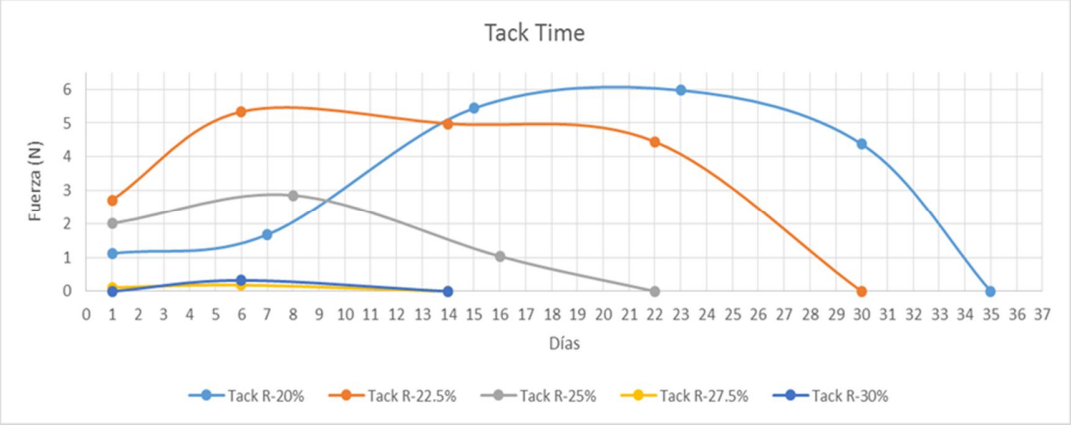


Figura 3. Estabilidad de la fuerza de tack de las resinas a través del tiempo.

Como se puede observar en la Fig. 3 el tiempo de tack en los preimpregnados con diferente formulación de resina se comportan de manera similar, al siguiente dia de haber sido preparados el tack se mantuvo en un valor mínimo en las diferentes resinas, sin embargo conforme avanzo el tiempo los preimpregnados fueron aumentando su fuerza de tack esto quiere decir que el sistema resina-iniciador empezó a polimerizar y a generar un sistema más adhesivo hasta llegar a un punto donde la fuerza de "peeling" o decapamiento es máxima a partir de este punto la resina continua polimerizando o curando

hasta que alcanza el máximo punto de curado o polimerización, que se presenta cuando la fuerza de tack llega a cero y el preimpregnado queda en su etapa final y este se encuentra en un estado rígido sin presentar adhesividad.

Sin embargo, de la Fig. 3 se puede decir que las resinas que presentaron una mejor estabilidad en el tiempo son las que contienen un porcentaje de RE-7000 de 20% y de 22.5%, ya que estas alcanzan una fuerza máxima de tack y se mantiene estable por varios días antes de que esta comience a descender. Al contrario de las que tienen una mayor concentración de RE-7000 que llegan a su estado máximo de tack y después decrece no se presenta estabilidad a través del tiempo, este resultados se deben a que la combinación iniciador-Resina(RE-7000) es muy violento y reacciona en cuestión de horas; mientras que las resinas con menor cantidad de resina epoxica Re-7000 y con mayor porcentaje de resina de epoxi acrilato es de reacción más lenta esto se debe a que la polimerización de epoxi acrilato es mediante el aumento de temperatura o por radiación UV.

Resistencia a la flexión de los preimpregnados

La Fig. 4 muestra la valoración de la resistencia a la flexión de los preimpregnados con diferentes concentraciones de resina epoxica. Se observó que la resistencia a la flexión decae conforme va aumentando la concentración de resina epoxica entonces se disminuye el grado de entrecruzamiento que ofrece la resina de epoxi acrilato junto con la resina de DGEBA y la trietilentetramina.

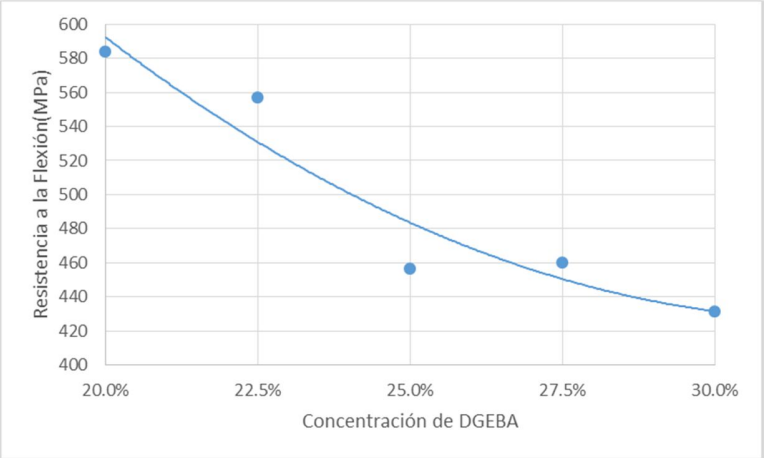


Figura 4. Resistencia a la flexión de los preimpregnados curados.

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una metodología con los equipos y materiales disponibles para la impregnación manual de la resina sobre fibra, además de poder evaluar su estabilidad en el tiempo por medio de la prueba de tack y una de sus propiedades mecánicas una vez curado el prepreg que en este caso fue la prueba de resistencia a la flexión.

Se obtuvo un material preimpregnado con un sistema de resina estable a temperatura ambiente y con buenas propiedades mecánicas en este caso el prepreg que contenía el sistema de resina con un contenido de Re-7000 de 20% obtuvo una estabilidad de 30 días a temperatura ambiente y una resistencia a la flexión de 583.85 MPa.

REFERENCIAS

[1] B. Ellis, *Chemistry and Technology of Epoxy Resins*. Springer Direct + Business Media Dordrecht, 1993.

[2] A. A. MIRAVETE, E. Larrodé, and L. Castejón, *Materiales Compuestos*. Editorial Reverte, 2000.

[3] F. Wolff-Fabris, H. Lengsfeld, and J. Krämer, "Prepregs and Their Precursors," in *Composite Technology*, Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, 2015, pp. 11–25.

[4] H. Tesch *et al.*, "Curable compositions based on epoxy resins," 1986.

[5] S. P. Qureshi and H. C. Gardner, "Prepreg with improved room temperature storage stability," 1993.

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PROTOTIPO FUNCIONAL DE MEMBRANAS DE QUITOSAN CON MICROCÁPSULAS DE TRICLOSAN PARA EL TRATAMIENTO DE LA PERIODONTITIS CRÓNICA.

[1]Herrera-Velázquez, C.H., [2]Ibarra-Wiley, R., [3]Trejo-Narvaez, N., y [3*]Herrera-Larrasilla, T.E.

1. Universidad Autónoma de Baja California,
2. Cima de BC, SA de CV Av. Rio Mocorito número 801, local 1, de la Colonia Independencia, Mexicali, Baja California, Código Postal 21290
3. Universidad Autónoma de Guadalajara / Av. Patria 1201, Av. Patria No 1201, Lomas del Valle.

*Autor para correspondencia: therrera@edu.uag.mx

Área del conocimiento: Ingeniería Química

RESUMEN
El quitosan es un polisacárido natural, biodegradable y biocompatible, que se obtiene principalmente a partir de la quitina, sustancia muy abundante en la naturaleza que forma el exoesqueleto de camarones y cangrejos. En los últimos años se ha incursado en la rama de la odontología en especialidades como: Cirugía y Periodoncia como agente antibacterial. En la periodoncia es de suma importancia el uso de antimicrobianos en enfermedades como la periodontitis crónica. La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa que provoca inflamación en el soporte de los dientes y pérdida ósea. Los agentes que se han utilizado para el tratamiento de esta enfermedad han sido clorhexidina y el triclosan. Se propone la elaboración de membranas de quitosan que contengan microcápsulas de triclosan, que se colocan en las bolsas periodontales de cada paciente, liberando el agente micro encapsulado en un lapso de un mes.

Palabras clave: Quitosan; triclosan; membranas; periodontitis crónica.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal crónica es una patología de gran relevancia entre la población mexicana. Esta enfermedad ha aumentado debido a varios tipos de factores etiológicos, por lo que es de suma importancia el desarrollo de nuevos aditamentos para la prevención o rehabilitación de dicha enfermedad.

El tratamiento base de dicha enfermedad es el raspado y alisado radicular; mediante el cual se ha demostrado una aceptable mejoría dentro de un tiempo considerado; en los últimos años se ha implementado el uso del PERIOCHIP®, un aditamento muy utilizado debido a su sistema de dosificación del agente antimicrobiano (clorhexidina). Debido a sus costos elevados no es apto para el campo Odontológico Mexicano.

En este trabajo de investigación se buscará tratar la enfermedad periodonto dañado por la enfermedad periodontal mediante el desarrollo de membranas de quitosan con microcápsulas de triclosan que es la combinación de dos agentes antibacterianos. Este proceso se llevará a cabo por medio de la liberación prolongada de los agentes antibacterianos durante un periodo determinado.

Al término de este trabajo de investigación podremos analizar los resultados de este producto que desarrollamos como tratamiento de la periodontitis crónica. Se trabajara en el desarrollo del prototipo funcional y en la estabilidad del proceso de producción para su comercialización.

Para esta investigación es importante hacer una breve mención de aquellos trabajos o proyectos que se han llevado acabo estos últimos años, en los cuales se ha tratado de añadir el uso del quitosan, como agente antimicrobiano.

En 2009 los investigadores Dubraska Suárez y Carlos García, elaboraron un gel de quitosano como propuesta terapéutica para la ESP (Estomatitis Subprotésica), aplicando una metodología más simplificada para la obtención del hidrogel, que consistió en obtener quitosano por desacetilación termoalcalina de exoesqueletos de camarones y su posterior transformación en gel vía templado ácido en medio acuoso.[1]

Esta formulación en forma de gel de quitosano, limitará el problema de la solubilidad y permitirá la liberación controlada de fármacos, o de sus componentes intrínsecos regeneradores de queratocitos, fibroblastos, y estimulador de otras células mediadores de la inflamación, así como su acción antibiótica, biocompatibilidad y escasa citotoxicidad, perfilan a este hidrogel como el candidato de elección para el tratamiento de la ESP y de otras patologías inflamatorias en Odontología, y una serie de potenciales usos, que, sin duda alguna, simplificarían el tratamiento del paciente odontológico .[1]

En 2011 los mismos investigadores Dubraska Suárez y Carlos García, incursionaron el uso y aplicación de biomembranas para tratar defectos óseos postquirúrgicos, las cuales fueron elaboradas en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Universidad de Los Andes.[2]; teniendo como prueba de sus resultados la publicación de un caso clínico. El cual constaba de aplicar dichas biomembranas posterior a la intervención quirúrgica (Cirugía de 3° molar); Los resultados plasmaron que el alveólo tratado con quitosano regeneró más rápido y el proceso inflamatorio fue menos agresivo que en el lado no tratado. Por tanto, la membrana de quitosano se pudiera considerar para ser colocada en defectos óseos postoperatorios entre otros. [2]

Cabe mencionar que esta es una breve reseña de los antecedentes históricos, resaltando así los artículos más importantes que nos ayudaron para fundamentar este proyecto de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la membrana

Se utilizó Quitosan de tipo comercial de origen chino de peso molecular medio. El Triclosan es de tipo USP de Organosíntesis, S. A. de C. V., Los reactivos utilizados para la microencapsulación fueron de tipo comercial. El método utilizado para la micro-encapsulación fue la coacervación compleja. La emulsión de microcápsulas se diseñó para obtener una concentración aproximada al 10% y el contenido de triclosan dentro de las microcápsulas de aproximadamente 20%.

El quitosan se caracterizó de acuerdo a algunas pruebas:

a) Determinación del grado de desacetilación por espectroscopia de FTIR.

b) Determinación del peso molecular por viscosimetría.

c) Determinación del grado de desacetilación por medio de valoración potenciométrica.

Las membranas de quitosan se obtuvieron por el método de evaporación, disolviendo el quitosan formulado con las microcápsulas de triclosan en una solución de ácido cítrico, dejando las formulaciones a temperatura ambiente. Se realizara el corte de las membranas mediante laser.

Evaluación Antimicrobiana in vitro

La evaluación se hizo utilizando dos métodos distintos para comprobar la efectividad del producto, método de difusión en agar y el método de adhesión a contacto en suspensión. Las pruebas se hicieron contra los siguientes microorganismos: *Candida albivans, Streptococcus mutantes y Staphylococcus aureus*.

Evaluación en pacientes

Se realizó un pre-selección de pacientes, tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Aquellos pacientes que padezcan enfermedad periodontal crónica diagnosticada.
- Tamaño de bolsas periodontales de 4mm a 6mm.
- Pacientes mayores a 25 años.

Se llevó a cabo la recolección de datos de periodontograma (registro gráfico en milímetros de la profundidad de las bolsas periodontales de cada órgano dental).

El tratamiento elegido para todos los pacientes fue fase uno periodontal, el cual consta de realizar un curetaje para la eliminación del sarro y placa dentobacteriana presente en las distintas superficies del órgano dental, este procedimiento se llevó siempre bajo anestesia local de la zona a trabajar. Durante el curetaje se irrigó con solución fisiológica, esto para eliminar cualquier residuo después de la acción mecánica, posterior a las irrigaciones y obteniendo una buena hemostasia, se procedió a colocar dentro de cada bolsa la membrana correspondiente. Las citas de control fueron a los siete y quince días posterior al mes de colocación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron las microcápsulas de triclosan en un rango de 10 a 40 micrómetros.

Caracterización del Quitosan

Quitosan	PM Viscosimetría g/mol	Grado de Desacetilación FTIR(%)	Grado de Desacetilación Potenciometrico.
Ditai	310,000	77.4%	70.7%
Senyek	495,000	80.4%	77.1%

Evaluación in vitro

Las membranas mostraron actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos seleccionados. Mostrando 100% de inhibición en la superficie de la muestra contra *Candida albicans*. En cuanto a *Streptococcus mutants* la membrana fue capaz de estimular un efecto antimicrobiano a distancia, generando un halo de inhibición; mediante el método de adhesión pudimos comprobar que la membrana logró erradicar el crecimiento de la bacteria. En cuanto a *Staphyloccus aureus*, la membrana logró un halo de inhibición hasta de 3mm.

Evaluación con pacientes

Las membranas de quitosan con microcápsulas de triclosan mostraron un efecto sinergista en el tratamiento de la periodontitis crónica, ya que reduce el nivel patológico de la bolsa y logra mantenerlo en niveles saludables, en un tiempo aproximado de 14 días.

El producto es de aplicación única y no requiere retirarse porque es bioabsorbible y biocompatible. El producto fue probado en 164 bolsas periodontales y en ninguna se observó rechazo o formación de edema como se ha reportado que ocurre en algunos casos con el producto PERIOCHIP®

Producto comercial

Se estandarizó un procedimiento para la preparación de las membranas y se decidió agregarles un color para mantener la uniformidad. La preparación se hizo en charolas de acero inoxidable, en una superficie nivelada y en ventilación controlada.

El corte se hace mediante tecnología láser, lo que permite personalizar las membranas.

Ya se hizo la solicitud de patente y el registro de marca. El nombre de producto es PERIOSAN®. Está pendiente el registro en Cofepris.

Se está trabajando en la imagen comercial y la estrategia de comercialización. Se trabaja aun en el precio de mercado que seguramente estará por debajo de la mitad del producto PERIOCHIP®.

CONCLUSIONES

Se comprobó que la unión quitosan con triclosan si generó un efecto sinergista en el tratamiento de la periodontitis crónica, de igual manera es importante hacer notar que con los tres productos probados se obtuvieron buenos resultados.

El uso de una membrana de quitosan con microcápsulas de triclosan proporciona un mejor efecto antimicrobiano en el tratamiento periodontal después de la primera semana de colocación, esto debido a la capacidad de liberación controlada del agente antimicrobiano encapsulado. Él tiempo aproximado de liberación del agente es de cuatro a seis semanas, siempre y cuando tres cuartas partes de la membrana se mantengan dentro de la bolsa.

Las membranas de quitosan con microcápsulas de triclosan son una buena opción para tratamientos periodontales a corto plazo, ya que reduce el nivel patológico de la bolsa y logra mantenerlo en niveles saludables por las cualidades antes mencionadas.

REFERENCIAS

[1] SUÁREZ D., GARCÍA C., VELAZCO G., ORTIZ R., GONZÁLEZ A.; 2009; BIOGEL DEQUITOSANO A PARTIR DE LA DESACETILACIÓN TERMOALCALINA DE CONCHAS DECAMARÓN PROPUESTA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESTOMATITIS SUBPROTÉSICA;*REVISTA ODONTOLOGICA DE LOS ANDES;* Volumen 4, Número 2; Pags 1-12

[2] SUÁREZ D., GARCÍA C., VELAZCO G., GONZÁLEZ A., YÉPEZ J.;2011, REGENERACIÓNOSTEOMUCOSA CON MEMBRANA DE QUITOSANO: REPORTE DE UN CASO; *REDOE -Revista Europea de Odontoestomatologia;* Pags: 1-18

[3] RATHBONE, HADGRAFT, ROBERTS; 2003; Modified-Release Drug Delivery Technology;*DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES;* United States Of America; Volumen 126, Pags.391-400.

CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y TÉRMICA DE DOS POLIMORFOS DE LA LACTOSA Y LA COMPARACIÓN DE SUS PROPIEDADES PARA SU USO COMO EXCIPIENTES.

[1,2]López-Pablos, A.L., [1]Silva-Cázares, M.B., [3]López-Martínez, L.A., [3]Martínez-Juárez, L.G., [4]Leyva-Porras, C.C., y [1]*Saavedra-Leos, M.Z.

1. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano, Carretera a Cedral km. 5+600, Ejido San José de las Trojes, Matehuala, S.L.P., C.P. 78700, México.
2. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales (DICIM), Sierra Leona 530, Col. Lomas, 2a. Sección, Planta Baja, San Luis Potosí, S.L.P, México.
3. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano Oeste, Carretera Salinas-Santo Domingo # 200, C.P. 78600 Tel. +52(496)963.4030 Salinas de Hidalgo, S.L.P México.
4. Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV), Miguel de Cervantes # 120, Complejo Industrial Chihuahua. C.P. 31109 Chihuahua, Chih., México.

*Autor para correspondencia: zenaida.saavedra@uaslp.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La lactosa farmacéutica, en estado amorfo o en las formas cristalinas α-lactosa monohidratada y β-lactosa anhidra, es utilizada como excipiente en una amplia variedad de dosis sólidas orales, como comprimidos, cápsulas, polvo para uso oral y microesferas para inhaladores de polvo seco. Aunado a esto, el tipo de forma farmacéutica, así como su proceso de fabricación, determinan la selección del tipo apropiado de lactosa. Un gran número de investigaciones se han orientado a la caracterización de los distintos tipos de lactosa con el fin de predecir su estabilidad a través del análisis de sus propiedades; no obstante, en la actualidad no se ha realizado un trabajo en el que se comparen sus propiedades físicas, químicas y térmicas para analizar la factibilidad de su uso como excipiente en diferentes formas farmacéuticas. Es por ello, que en esta investigación se caracterizaron física, química y térmicamente los dos polimorfos más comunes y comerciales de la lactosa, la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra, mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y análisis termogravimétrico con calorimetría diferencial de barrido simultáneos, con el fin de establecer su mejor aplicación como excipientes, mediante el análisis y comparación de sus diferentes propiedades.

Palabras clave: Lactosa; polimorfos; caracterización; propiedades; excipientes.

INTRODUCCIÓN

La **lactosa** (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranosa) se encuentra exclusivamente en la leche de los mamíferos y está constituida por una molécula de galactosa y otra de glucosa, unidas mediante un enlace glucosídico β (1,4). Existe en los isómeros **α** y **β** y, por lo tanto, presenta el fenómeno de mutarrotación [1]. En la industria farmacéutica, la lactosa es la base de más del 20 por ciento de los fármacos de venta por prescripción y de aproximadamente el 65 por ciento de los medicamentos de venta libre. En estos casos, es utilizada como excipiente, el cual es una sustancia que ayuda a que el

principio activo del medicamento funcione de forma estable, eficaz y segura para el paciente que lo toma.

La lactosa farmacéutica puede ser encontrada en estado cristalino, en estado amorfo o en una mezcla de ambos. En la lactosa amorfa, las moléculas no están organizadas de acuerdo a un patrón regular; es una mezcla de moléculas de α- y β-lactosa, y tiene un alto estado de energía, comparada con la lactosa cristalina, por lo que es termodinámicamente inestable. Se obtiene cuando una solución se seca rápidamente, tal como en el secado por aspersión o la liofilización; aunque también puede formarse mediante procesos mecánicos, como la molienda [2]. Por otro lado, la lactosa cristalina presenta una estructura bien ordenada, con la forma exacta de un cristal, la cual depende de las condiciones de cristalización [3]; además, presenta polimorfismo, es decir, puede cristalizar en diferentes formas [4]. Diversos autores han establecido que existen cuatro formas polimórficas reconocidas de la lactosa, que consisten en una forma hidratada: α-lactosa monohidratada ($L_{\alpha \cdot H2O}$); y tres anhidras: β-lactosa anhidra (L_{β}), α-lactosa anhidra higroscópica inestable ($L_{\alpha H}$) y α-lactosa anhidra estable ($L_{\alpha S}$) [5,6].

Las formas cristalina y amorfa de la lactosa en un mismo material muestran diferencias de tamaño y forma de partícula, densidad, propiedades fisicoquímicas, estabilidad química, solubilidad en agua, higroscopicidad, propiedades de flujo y compactabilidad [7,8]. De esta manera, la estructura del estado sólido puede determinar el tipo de procesamiento de un material y la biodisponibilidad de una forma sólida oral [9,10,11].

En la industria farmacéutica, la lactosa se utiliza en una amplia variedad de dosis sólidas orales, tales como comprimidos, cápsulas, sobres con polvo para uso oral y microesferas para inhaladores de polvo seco. En el caso específico de los comprimidos, éstos pueden obtenerse utilizando dos procesos: el de compactación directa y el de granulación vía húmeda. La compactación o compresión directa es un método que requiere un excipiente aglutinante efectivo con buenas propiedades cohesivas y de fluidez en estado seco y ser capaz de unirse a otros materiales para dar masa compacta con baja presión de la máquina de comprimir. Asimismo, la granulación por vía húmeda, también requiere excipientes con características de cohesividad y compresibilidad altas, aunque con una propiedad de fluidez baja [12]. En el caso de los polvos para uso oral, éstos son preparaciones que contienen partículas sólidas, independientes y secas, con un tamaño variable; pueden contener uno o más principios activos y ser formulados para crecer el volumen, incluso sin excipientes. Las microesferas para inhaladores de polvo seco (DPIs) son muy populares recientemente para el tratamiento de diversas enfermedades respiratorias [13,14], ya que el fármaco es depositado directamente en el pulmón mediante el uso de este dispositivo. La eficiencia de los DPIs depende no sólo del tamaño de las microesferas, sino también de la cantidad de partículas de lactosa finas presentes en las formulaciones, así como de la rugosidad de las mismas. Por ejemplo, las partículas deben tener diámetros de hasta 5µm, para una deposición eficiente en el pulmón del paciente [15,16], por lo que pequeños cambios en el tamaño de las partículas dentro del intervalo de 1-10 micras produce un impacto importante en la dispersión de los polvos [17,18]. Por otro lado, el desempeño aerodinámico de los DPIs se ve afectado significativamente por la rugosidad de las partículas acarreadoras [19,20], tan es así que se ha predicho una reducción de la cohesión de las partículas arriba del 90% cuando las partículas son corrugadas, comparadas con partículas esféricas.

Si bien es cierto que existe una gran cantidad de investigaciones dirigidas a la caracterización de las distintas formas de lactosa (amorfa y cristalina), en la actualidad no se ha realizado un trabajo en el que se comparen sus propiedades físicas, químicas y térmicas para analizar la factibilidad de su uso como excipientes en diferentes formas farmacéuticas. Es por ello, que en esta investigación se caracterizarán física, química y térmicamente los dos polimorfos más comunes y comerciales de la lactosa, la α-lactosa monohidratada ($L\alpha \cdot H_2O$) y la β-lactosa anhidra (Lβ), con el fin de establecer su mejor aplicación como excipientes en distintas formas sólidas orales, mediante el análisis y comparación de sus diferentes propiedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó α-lactosa monohidratada con una pureza ≥ 99% marca Sigma® y una β-lactosa obtenida en el laboratorio por el método de Olano y Ríos [21], a las cuales se les efectuaron los análisis descritos a continuación.

Caracterización química de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

El análisis fue realizado en un espectrofotómetro de infrarrojo marca Thermo, modelo Nicolet iS50 FTIR, empleando su accesorio Smart Orbit de reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante. Para la interpretación de los espectros se usó el software Omnic 9.3.32., que fueron adquiridos en un intervalo de 4000 a 600 cm^{-1}, con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos por análisis. Antes de cada análisis se registró la lectura de un blanco correspondiente al portamuestras sin muestra.

Caracterización química de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra por espectroscopía Raman.

La caracterización por Raman se llevó a cabo utilizando el espectrómetro Horiba LabRam HR Evolution, Tecnología Jobin Yvon. Como fuente de excitación, se empleó un láser rojo de He-Ne con una longitud de onda de 633 nm. Dicho láser fue enfocado a la muestra por medio de un objetivo 100x del microscopio BXFM-ILHS Olympus. La luz dispersada fue recolectada por el mismo objetivo y difractada posteriormente por un espectrómetro Jobin Yvon con una red de 600 líneas/mm, en un intervalo de 50 a 3350 cm^{-1}.

Caracterización térmica por TGA-DSC simultáneo de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra.

Las muestras se pesaron en un rango de 2 a 4 mg y se utilizaron celdas de aluminio Tzero® (TA Instruments) para ser analizadas en un equipo TGA-DSC SDT Q600 (TA Instruments, USA). Para DSC, la línea base fue calibrada con Indio (156.60°C, 28.47 J/g) y la capacidad calorífica, con zafiros. Las corridas se llevaron a cabo a una velocidad de calentamiento de 40°C/min en un rango de 25 a 500 °C. Se utilizó el software Universal Analysis 2000© para la obtención de los termogramas y la determinación de parámetros como la pérdida de masa (% w/w), la temperatura de fusión y la temperatura de degradación. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Caracterización física de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra mediante Rayos X de Polvos (PXRD).

Se utilizó un difractómetro de rayos X marca PANalytical, modelo Empyrean, equipado con un detector X'Celerator en una geometría Bragg-Brentano. El barrido de las muestras se realizó en un rango de 2θ de 0° a 100°.

Caracterización física de la α-Lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se empleó un microscopio electrónico de barrido modelo Nova NanoSEM 200 de la marca FEI Company, en modalidad de alto vacío, que cuenta con un detector de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDX) INCAx-sight marca Oxford, para el análisis químico elemental de las zonas de interés, con una precisión de 1% wt. Se colocó una porción de cada muestra sobre una cinta de carbono adherida a un portamuestra de aluminio, y después se observó y analizó en la modalidad de alto vacío.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectros de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra.

Los espectros de FTIR se muestran en la Figura 1, para la α-lactosa monohidratada marca Sigma y la β-lactosa obtenida en el laboratorio; los cuales coinciden con los reportados por diversos autores [6, 22]. Para la α-lactosa (Figura 1a), se presentan las bandas de mediana intensidad en 3200 a 3600 cm^{-1}, correspondientes a la vibración de estiramiento simétrico de los grupos hidroxilo (OH) en la molécula de lactosa. Se muestra también la banda débil a 1650 cm^{-1} que mencionan estos autores, referente a la vibración de estiramiento asimétrico de los grupos hidroxilo del agua cristalizada. La banda de alta intensidad en 1070 a 1200 cm^{-1} se debe a la vibración de flexión del enlace glicosídico (C-O-C) que une a las moléculas de galactosa y glucosa en la lactosa, considerado también como un enlace éter. Así mismo, se observa la banda característica del anómero α a 915 cm^{-1} [6].

En lo que respecta al espectro de la muestra de β-lactosa (Figura 1b), se exhibe, al igual que en espectro del anómero α, la banda en 3200 a 3600 cm^{-1}, correspondiente a la vibración de estiramiento simétrico de los grupos hidroxilo, así como la banda en 1070 a 1200 cm^{-1}, perteneciente a la vibración de flexión del enlace glicosídico. La banda característica del anómero β puede observarse a 948 cm^{-1}, la cual también coincide con el espectro de IR de este polimorfo, reportado ya anteriormente [6].

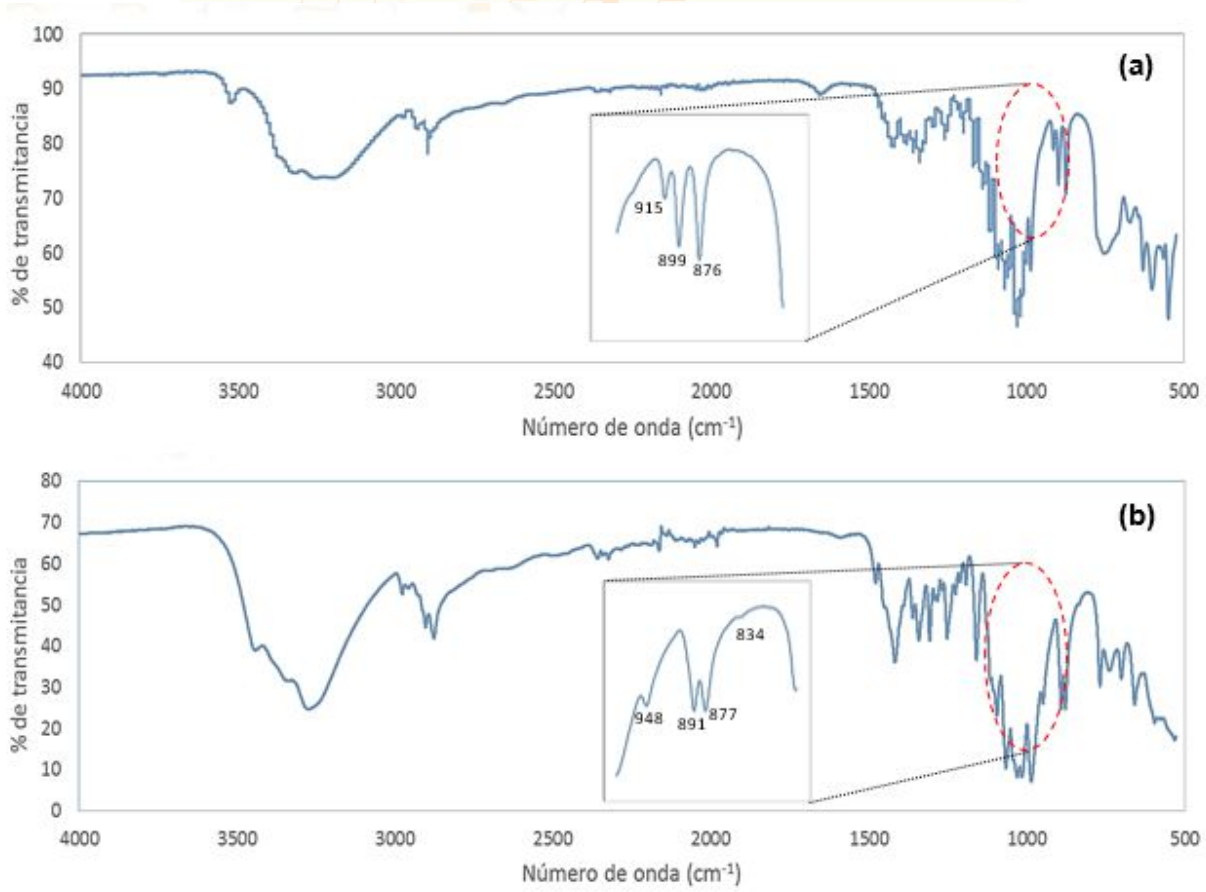


Figura 1. *Espectros de FTIR de α-lactosa monohidratada (a) y β-lactosa anhidra (b).*

Espectros de Raman de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra.

Los espectros de Raman para la α-lactosa monohidratada marca Sigma y la β-lactosa obtenida en el laboratorio pueden observarse en las Figuras 2 y 3. Para ambos espectros, las bandas encontradas entre 1,300 y 1400 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de los enlaces C-H [23]; aunado a esto y en comparación con resultados anteriormente reportados [6,24], las bandas observadas entre 1000 y 1200 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento del grupo C-O-C (enlace glicosídico), mientras que las vibraciones de estiramiento para el grupo O-C-O se encuentran en los 865 cm^{-1}.

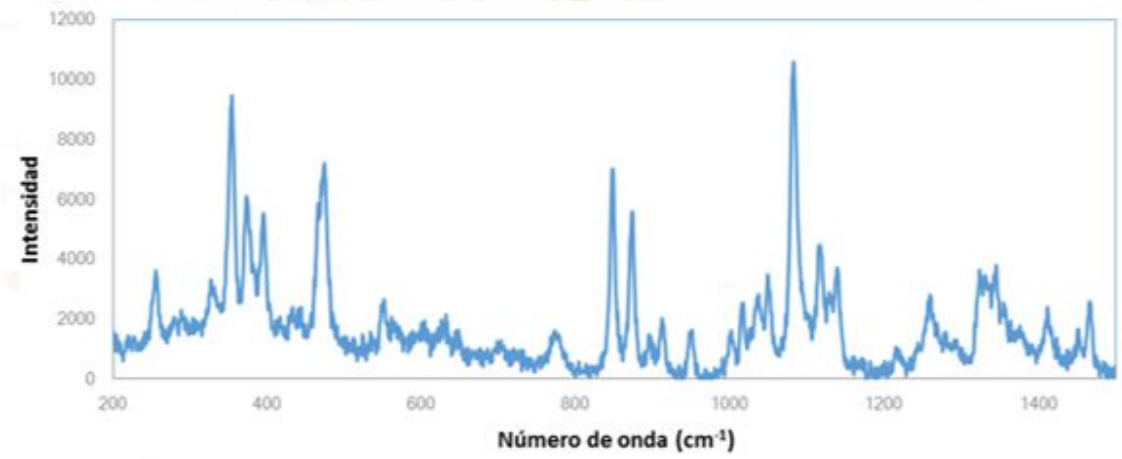


Figura 2. *Espectros de Raman de α-lactosa monohidratada.*

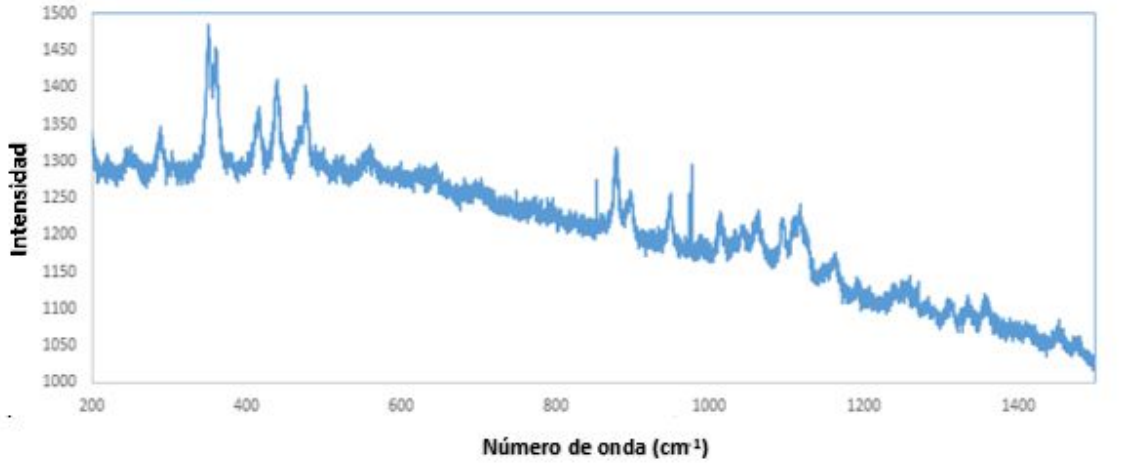


Figura 3. *Espectros de Raman de β-lactosa anhidra.*

Termogramas de TGA-DSC simultáneo de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra.

Una vez determinada la presencia de α-lactosa monohidratada y de β-lactosa anhidra en las muestras analizadas, se sometieron a un análisis térmico mediante TGA-DSC simultáneo, con el fin de determinar las temperaturas de degradación y de fusión de los cristales de las mismas. En las Figuras 4 y 5 se muestran los termogramas de TGA-DSC de ambos polimorfos. Para la α-lactosa (Figura 4) se observan tres eventos térmicos en el termograma de DSC. De acuerdo a diversos autores [22,25,26], el primer endoterma, ubicado alrededor de los 145°C, es atribuido a la pérdida de agua de cristalización; el endoterma ubicado en los 213°C se debe a la fusión de los cristales de α-lactosa monohidratada. Ambos endotermas coinciden con un cambio en la pendiente en la curva de TGA, que corresponde en una pérdida de peso de aproximadamente 10%. El tercer endoterma, ubicado a 292.45°C corresponde a la degradación térmica del polimorfo, lo cual es corroborado con un cambio abrupto en la pendiente en el termograma de TGA, equivalente a una pérdida de peso de alrededor del 40%, lo cual es característico de un evento de degradación del material. Cabe mencionar que las temperaturas a las que se encuentran los endotermas difieren un poco con respecto a las obtenidas por los autores antes mencionados, incluso, existe variación entre las de cada uno. Esto se debe a las velocidades de calentamiento utilizadas durante el análisis. Con respecto al temograma de la β-lactosa anhidra (Figura 5), se observa sólo un evento térmico a los 231°, el cual se debe a la degradación térmica del polimorfo. Esto se confirma con el cambio en la pendiente mostrado a esta temperatura en la curva de TGA, el cual exhibe una pérdida de peso de alrededor del 40%.

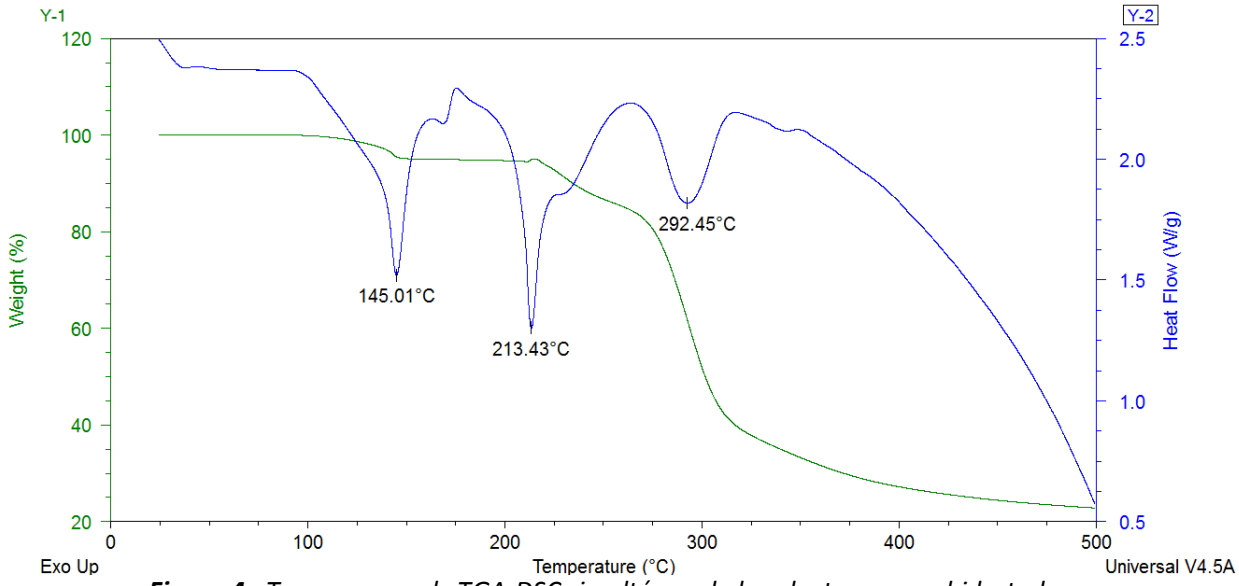


Figura 4. *Termograma de TGA-DSC simultáneo de la α-lactosa monohidratada.*

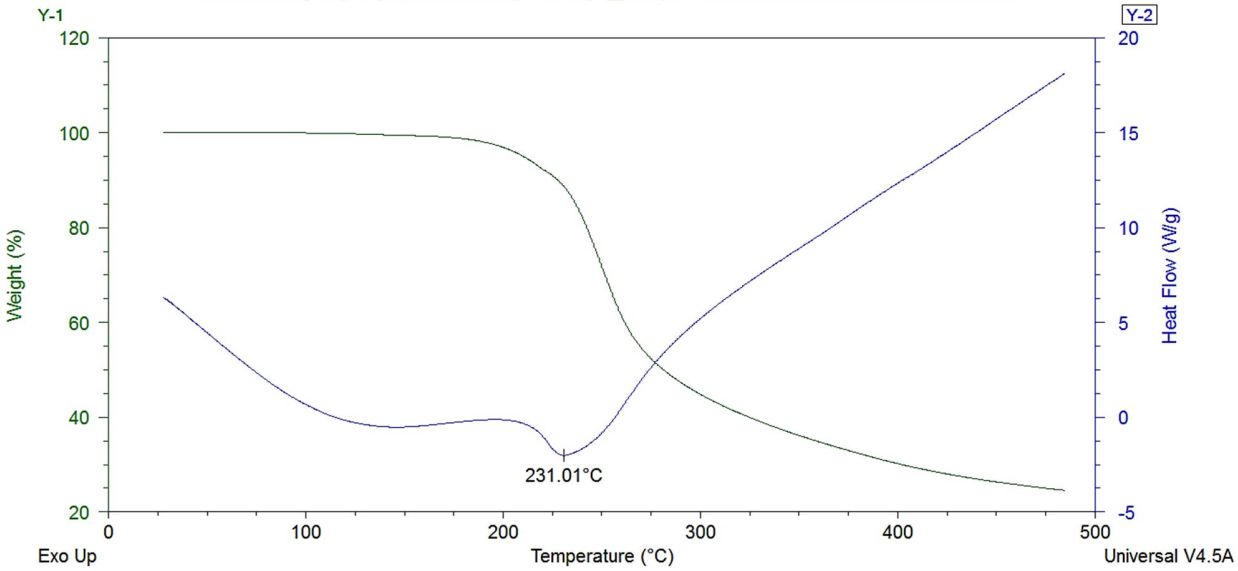


Figura 5. *Termograma de TGA-DSC simultáneo de la β-lactosa anhidra.*

Difractogramas de Rayos X de Polvos (PXRD) de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra.
Los difractogramas obtenidos para la α-lactosa monohidratada marca Sigma y la β-lactosa obtenida en el laboratorio se muestran en las Figuras 6 y 7, y en ellas se pueden observar claramente los picos bien definidos, propios del estado cristalino. Ambos difractogramas concuerdan con los obtenidos previamente por otros autores [6,25,27]. El difractograma de la forma α monohidratada (Figura 6), presenta picos de difracción bien definidos, propios del estado cristalino, en 12.39-12.53°, 16.2-16.38°, 19.12° y 19.59°. Para el caso de la β anhidra (Figura 7), estos picos se exhiben en 10.5°, 18.8-20° y 20.5-21.5°.

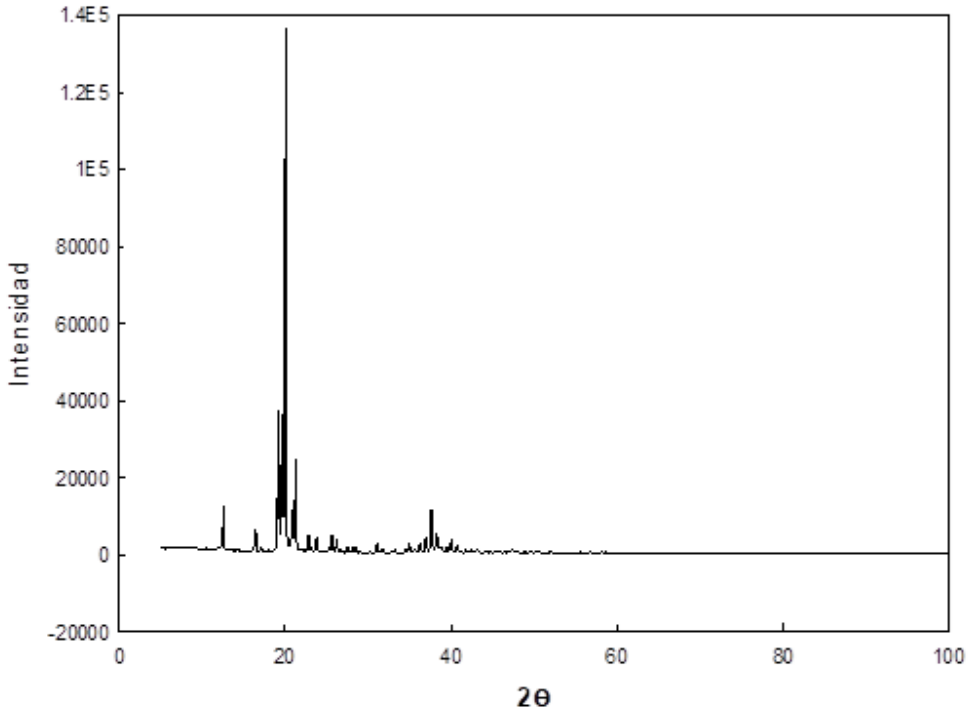


Figura 6. *Difractograma de PXRD de la α-lactosa monohidratada.*

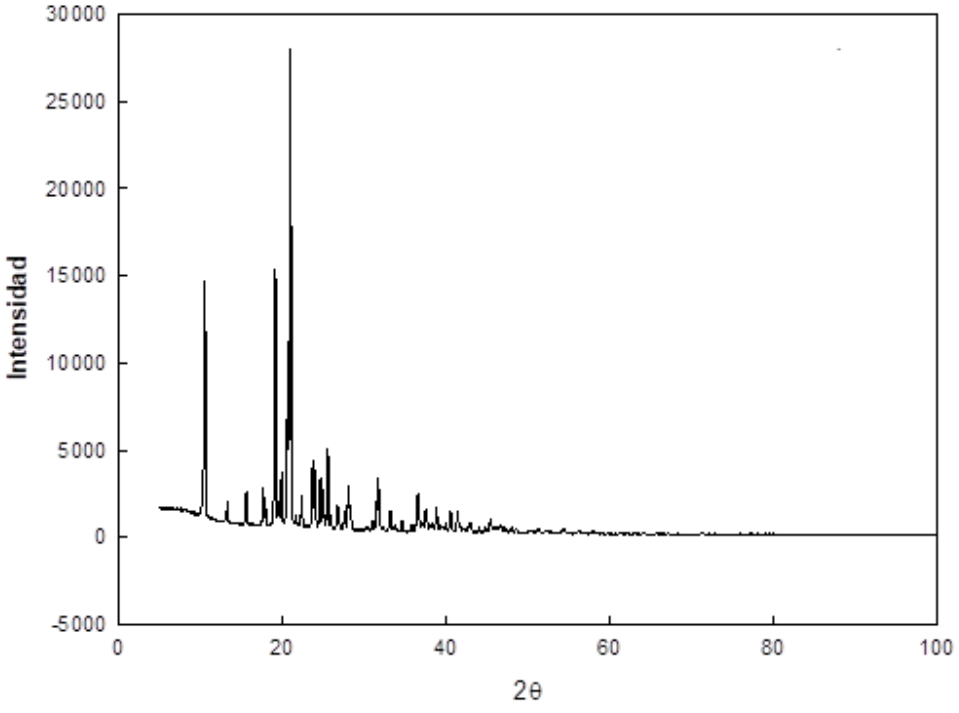


Figura 7. *Difractograma de PXRD de la β-lactosa anhidra.*

Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra.

Para finalizar, se obtuvieron micrografías de SEM a distintos aumentos (1000x, 5000x y 10000x) de la α-lactosa monohidratada marca Sigma y la β-lactosa anhidra obtenida en el laboratorio. Lo anterior, con el fin de conocer la forma y el tamaño de las partículas que conformaban las muestras, así como la textura de las mismas.

En la Figura 8 se presentan las micrografías correspondientes a la α-lactosa y, específicamente en la de 1000x, se puede observar que una gran parte de las partículas exhiben la forma de hacha de guerra característica de los cristales de este polimorfo [4]. Aunado a lo anterior, el tamaño de partícula promedio oscila entre los 20 y los 25 µm. Con respecto a la textura, las partículas muestran una superficie rugosa y un tanto irregular, lo cual se puede confirmar especialmente en las micrografías de 5000x y 10000x.

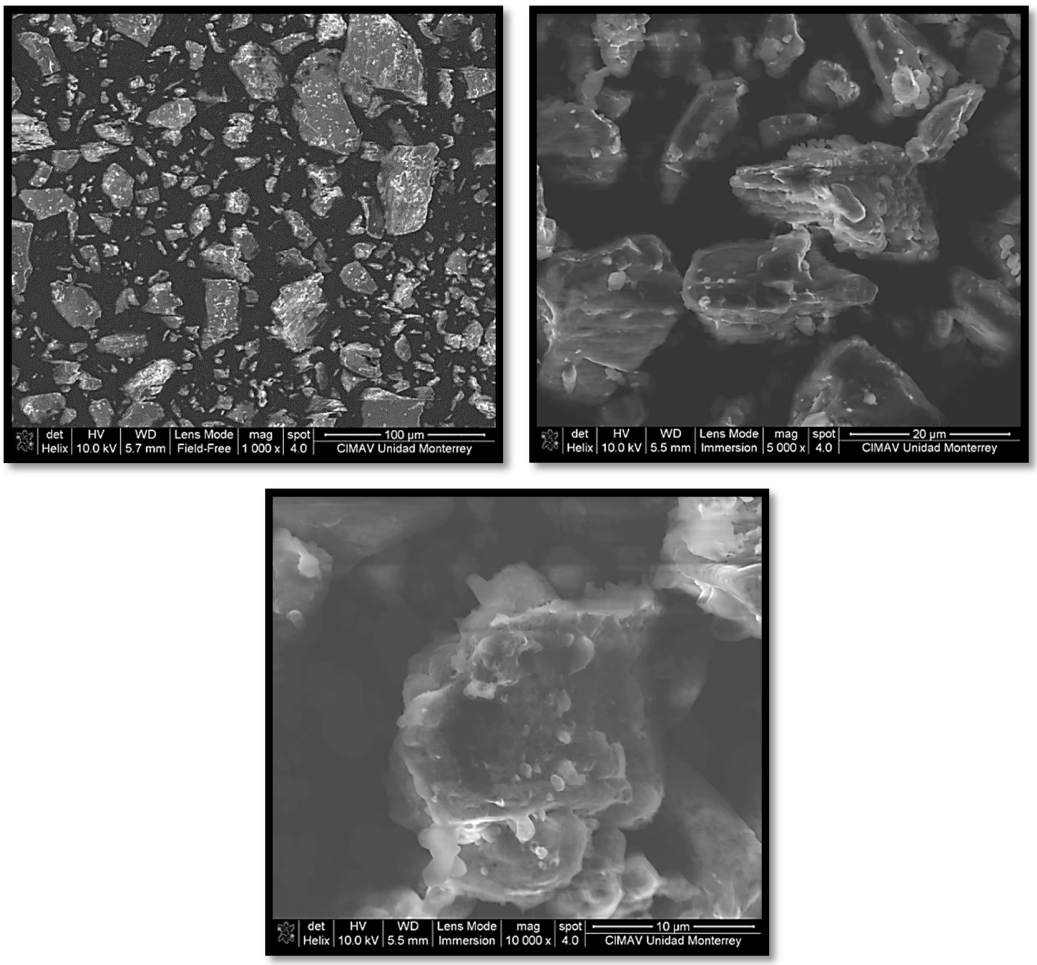


Figura 8. *Micrografías de SEM de la α-lactosa monohidratada a 1000x (imagen superior izquierda), 5000x (imagen superior derecha) y 10000x (imagen inferior).*

En la Figura 9 se muestran las micrografías de la β-lactosa a los mismos aumentos utilizados en la α-. A diferencia de las partículas de α-lactosa monohidratada, en la micrografía de 1000x, puede observarse que las partículas del polimorfo β- se encuentran unidas en pequeños conglomerados con tamaños que varían entre los 25 y los 75 µm. En la micrografía de 5000x se comprueba esto, ya que se muestra claramente como estos conglomerados están compuestos de partículas de un tamaño que oscila entre los 6 y los 10 µm. Respecto a la forma de las partículas, éstas presentan una geometría irregular. Por último, en la micrografía de 10000x se observa que las partículas exhiben una superficie con una rugosidad casi nula, en comparación con la del polimorfo α-.

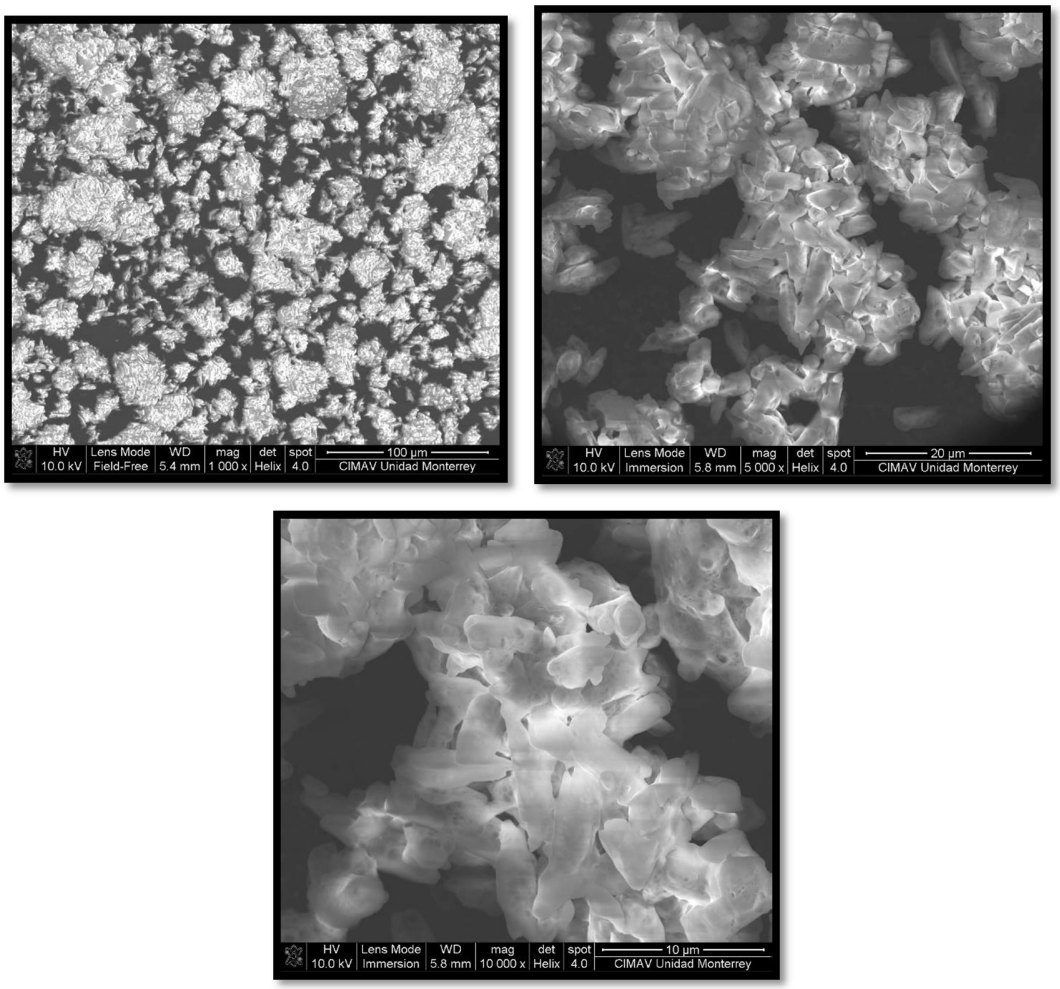


Figura 9. *Micrografías de SEM de la β-lactosa anhidra a 1000x (imagen superior izquierda), 5000x (imagen superior derecha) y 10000x (imagen inferior).*

CONCLUSIONES

En lo que respecta a la **α-lactosa monohidratada**, es sabido que la presencia de moléculas de agua en su estructura cristalina tiende a aumentar la cohesividad entre las partículas que la conforman y, por lo tanto, a tener una fluidez casi nula. Asimismo, con ayuda de las micrografías de SEM se pudo observar que las partículas de este polimorfo mostraban una superficie rugosa, característica que impide que fluyan con facilidad. Por lo anterior, el uso de este polimorfo no es adecuado en dispositivos de

inhalación de polvos (DPIs), en los que se busca una alta fluidez de las partículas acarreadoras. Por otro lado, con el análisis de SEM también se pudo determinar que el tamaño de las partículas de α-lactosa monohidratada no es adecuado para su uso estos dispositivos, ya que para ellos se requieren partículas con un tamaño entre 1-10 µm, y las de las muestras analizadas lo rebasan a más del doble. Aunado a lo anterior, la cohesividad antes mencionada entre las partículas de este polimorfo, lo hace tener una baja compresibilidad, no siendo apta para su utilización en la fabricación de tabletas por compactación directa; por tales razones, su uso se ve limitado a la fabricación de tabletas por granulación húmeda.

Para el caso de la **β-lactosa anhidra**, la ausencia de agua en su estructura cristalina disminuye significativamente las fuerzas de cohesión entre las partículas que la conforman, aumentando su fluidez y confiriéndole una alta compresibilidad para ser usada en la fabricación de tabletas por compactación directa. Por otro lado, el análisis por SEM permitió observar la superficie casi lisa de las partículas de este polimorfo, propiedad que facilita la fluidez; asimismo, se determinó que el tamaño de las mismas oscilaba entre los 6-10 µm. Por lo tanto, ambas características de rugosidad y tamaño, vuelven a la β-lactosa anhidra apropiada para su uso en DPIs, en los que, como ya se dijo anteriormente, las partículas que lo conforman deben tener una alta fluidez y un tamaño entre los 1 a los 10 µm, para lograr que la deposición pulmonar en el paciente sea lo más eficiente posible, ya que entre mayor deposición existe una mayor biodisponibilidad del medicamento en la persona que lo inhala. No obstante, es importante mencionar que la unión de las partículas de β-lactosa anhidra en conglomerados de 20 a 25 µm puede afectar el uso de ésta en DPIs. En la revisión bibliográfica se establece que la forma y rugosidad de las partículas de un polimorfo, así como su unión en pequeños conglomerados, está ampliamente asociado al método y a las condiciones de obtención del mismo. Por esta razón, se recomienda probar otros métodos o condiciones para obtener β-lactosa anhidra en partículas individuales, tal como en el caso de la α-lactosa monohidratada.

REFERENCIAS

[1] S. Badui Dergal, "Química de los alimentos," 4ª edición, Alhambra Mexicana: México, 1986, pp. 373-374.

[2] H. Newell, G. Buckton, D. Butler, F. Thielmann, and W.R. Daryl, "The use of inverse phase gas chromatography to measure the surface energy of crystalline, amorphous, and recently milled lactose," *Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 5, pp. 662-666, 2001.

[3] P. Walstra and R. Jenness, "Dairy Chemistry and Physics," John Wiley and Sons, New York, pp. 27-41, 1984.

[4] M. Carpin, H. Bertelsen, J.K. Bech, R. Jeantet, J. Risbo, and P. Schuck, "Trends in Food Science & Technology Caking of lactose : A critical review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 53, pp. 1–12, 2016.

[5] S. Ziffels and H. Steckel, "Influence of amorphous content on compactation behavior of anhydrous α-lactose," *International journal of pharmaceutics*, vol. 387, pp. 71-78, 2010.

[6] J.H. Kirk, S.E. Dann, and C.G. Blatchford, "Lactose: A definitive guide to polymorph determination," *International journal of pharmaceutics*, vol. 334, pp. 103-114, 2007.

[7] Y. Nakai, E. Fukuoka, S. Nakajima, and J. Hasegawa, "Crystallinity and physical characteristics of microcrystalline cellulose," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 25, pp. 96–101, 1977.

[8] C. Sund and D.J.W. Grant, "Influence of crystal structure on the tableting properties of Sulfamerazine polymorphs," *Pharmaceutical Research*, vol. 18, pp. 274–280, 2001.

[9] B.C. Hancock and G. Zografi, "Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 86, pp. 1–12, 1997.
[10] G.K. Bolhius, and C.F. Lerk, "Evaluation of excipients for direct compression," *Pharmaceutisch Weekblad*, vol. 108, pp. 469–481, 1973.
[11] C.F. Lerk, G.K. Bolhius, and A.H. de Boer, "Comparative evaluation of excipients for direct compression," *Pharmaceutisch Weekblad*, vol. 109, pp. 945–955, 1974.
[12] M.T. Morales, "Formas farmacéuticas sólidas: Tabletas," [online] *Grupo Gylsa, S.A. de C.V.*, pp. 1-27, 2017. Disponible en: http://es.calameo.com/read/003652856d2b7034e3786
[13] M.P. Timsina, G.P. Martin, C. Marriott, D. Ganderton, and M. Yianneskis, "Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 101, no. 1-2. pp. 1-13, 1994.
[14] M.J. Telko and A.J. Hickey, "Dry powder inhaler formulation," *Respiratory Care*, vol. 50, no. 9. pp. 1209-1227, 2005.
[15] H. Steckel and H.G. Brandes, "A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 278, no. 1. pp. 187-195, 2004.
[16] N. Rasenack and B.W. Müller, "Micron-size drug particles: common and novel micronization techniques," Pharmaceutical Development and technology, vol. 9, no. 1. pp. 1-13, 2004.
[17] M. Louey, M. Van Oort, and A. Hickey, "Aerosol dispersion of respirable particles in narrow size distributions using drug-alone and lactose-blend formulations," *Pharmaceutical Research*, vol. 21. pp. 1207-1213, 2004.
[18] M.D. Louey and P.J. Stewart, "Particle interactions involved in aerosol dispersion of ternary interactive mixtures," Pharmaceutical Research, vol. 19. pp. 1524-1531, 2002.
[19] F. Podczech, "The influence of particle size distribution and surface roughness of carrier particles on the *in vitro* properties of dry powder inhalations," *Aerosol Science and Technology*, vol. 31. pp. 301-321, 1999.
[20] X.M. Zeng, G.P. Martin, C. Marriot, and J. Pritchard, "The influence of carrier morphology on drug delivery by dry powder inhalers," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 200. pp. 93-106, 2000.
[21] A. Olano and J.J. Rios, "Treatment of lactose with alkaline methanolic solution: Production of beta-lactose from alpha-lactose hydrate," *Journal of Dairy Science*, vol. 61. pp. 300-302, 1978.
[22] Y. Listiohadi, J.A. Hourigan, R.W. Sleigh, and R.J. Steele, "Thermal analysis of amorphous lactose and α-lactose monohydrate," *Dairy Science and Technology*, vol. 89. pp. 43-67, 2009.
[23] R.M. Silverstein, F.X. Webster, and D.J. Kiemle, "Spectrometric Identification of Organic Compounds," 7th Edition, Ed. John Wiley & Sons, Inc: United States of America, 2005, pp. 24-25.
[24] B.M. Murphy, S.W. Prescott, and I. Larson, "Measurement of lactose crystallinity using Raman spectroscopy," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 38, no. 1. pp. 186–190, 2005.
[25] L.O. Figura and M. Epple, "Anhydrous alpha-lactose: a study with DSC and TXRD," *Journal of Thermal Analysis*, vol. 44. pp. 45–53, 1995.
[26] K. Kho and K. Hadinoto, "Dry powder inhaler delivery of amorphous drug nanoparticles: Effects of the lactose carrier particle shape and size," *Powder Technology*, vol. 233, pp. 303–311, 2013.
[27] A. Gombás, I. Antal, P. Szabo-Révéz, S. Marton, and I. Eros, "Quantitative determination of cristallinity of alpha-lactose monohydate by Near Infrarred Spectroscipy (NISR)," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 256. pp. 25-32, 2002.

TRACE ELEMENTS USED IN PATIENTS MAY CAUSE OXIDATIVE DAMAGE IN BRAIN OF RATS WITH HYPOTENSION INDUCED.

[1]Calderón-Guzmán, D., [2]Ortiz-Herrera, M., [1]Osnaya-Brizuela, N., [1]Barragán-Mejía, G., [3]Juárez-Olguín, H., [3]Hernández-García, E. y [1] Valenzuela-Peraza, A.

1. Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Secretaria de Salud (SSA). México.
2. Laboratorio de Bacteriología Experimental, INP, SSA. México.
3. Laboratorio de Farmacología, INP, SSA. México.

*Autor para correspondencia: osnayanorna@hotmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

Hypertension cause neuronal damage and apoptosis in brain. However, diazoxide a drug used to hypertension and its effect on 5-HIAA and dopamine amines in adult animal models remains unclear. The purpose of this study was to determine the effect of oligoelements on 5-HIAA and dopamine of adult rats' brain in presence of diazoxide. Methods. Male Fisher rats (weight 250 g) were treated as follows: Group I NaCl 0.9% (as control), group II tracefusin® (1.5ml/rat), group III diazoxide (20mg/rat); and group IV tracefusin® (1.5ml/rat) + diazoxide (20mg/rat), all doses were administered intraperitoneally daily for 4 days. The brain of animals was obtained and dissected in cortex, hemispheres and cerebellum/medulla oblongata to measure levels of 5-HIAA, dopamine, lipid peroxidation and total ATPase activity through validated methods. Results. Dopamine and 5-HIAA levels decreased significantly in the group that received trace elements and diazoxide in the hemispheres regions, and dopamine increased significantly in the groups that received diazoxide alone in cerebellum/medulla oblongata regions. Lipid peroxidation increased significantly in the groups that received trace elements and diazoxide in all brain regions. ATPase dependent of calcium and magnesium decreased in the groups that received diazoxide alone or combined with trace elements in cerebellum/medulla oblongata regions. Conclusion. The present results suggest that the use of trace elements and diazoxide alter metabolism of dopamine and 5-HIAA amines. Free radicals may be involved in this effect.

Palabras clave: *Brain damage, trace elements, diazoxide, hypotension*

REFERENCIAS

[1] Ozcelik D, Uzun H: Copper intoxication; antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. Biol Trace Elem Res 2009, 127, 45-529.

[2] Zhang J, Li H, Zhou G, Wang Y. Changes of endoplasmic reticulum stress- and apoptosis-related factors in rat cerebral cortex following controlled hypotension. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2014; 34(12):1804-8.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE HOJA DE *Gnaphalium viscosum* (Kunth), SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.

[1]Hernández-Gómez, K.A., [2]Valadez-Vega, M.C., [2]Cruz-Castañeda, A., [2]Izquierdo-Vega, J.A., y [2]Sánchez-Gutiérrez, M.

1. Instituto de Ciencias Básica e Ingeniería *, Facultad de Biología, Carretera Pachuca-Tulancingo, Mineral de la Reforma, México 42074.
2. Instituto de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Ex Hacienda la Concepción Pachuca – Tilcuautla, México 42060.

*Autor para correspondencia: engel_anahy@hotmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
En México el cáncer de mama representa una de las casusas de muerte en mujeres. Estudios recientes indican que algunas especies del género *Gnaphalium* poseen efecto anticancerígenos sobre diferentes líneas celulares. Por ello, este presente trabajo se propuso evaluar la actividad antioxidante y citotóxica del extracto de Acetato de etilo hoja de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre la línea celular de cáncer de mama. Para dicho objetivo se emplearon las técnicas de ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico y 2,2 difenil-1-picrilhidracilo para medir actividad antioxidante y el ensayo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol para evaluar el efecto citotóxico. Los resultados de actividad antioxidante mostraron diferencias en su actividad en ambas técnicas, siendo más efectivo el método ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico. El estudio de viabilidad celular mostró que el extracto tiene un efecto citotóxico, ya que a la concentración más baja probada de 100 µg/mL, se obtuvo una viabilidad de 31.41%, mientras que a la concentración de 1000 µL/mL, se obtuvo una viabilidad de 88.74 %; obteniéndose una Dosis inhibitoria media de 250 µg/mL. Esto resultados indican que el extracto presentó actividad antioxidante, logrando inhibir la formación de radicales; así mismo, dicho extracto mostró gran citotoxicidad sobre la línea celular estudiada.

Palabras clave: Oncológicas; radical; viabilidad; dosis inhibitoria; concentración.

INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial, el cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población y en las mujeres [1]. En México en el año 2015 se registraron 6,252 defunciones en mujeres con una tasa cruda de 18 defunciones por 100,000 mujeres [1], dada esta problemática de salud mundial se ha llevado el interés de buscar anticancerígenos naturales en diferentes especies vegetales. Algunos géneros *Gnaphalium* (Gordolobo) poseen compuestos que presentan actividad anti-cancerígena, tal como la especie *Gnaphalium viscosum* (Kunth) que ha sido estudiada por uso medicinal tradicional, estudios previos indican que posee el flavonoide 5-hidroxi-3,7 dimetoxiflavona este compuesto ha demostrado que posee actividad anti-cancerígena en células de adenocarcinoma de mama (línea MCF-7) [2].

El gordolobo pertenece a la familia Asteraceae la cual comprende gran diversidad de especies en todo el mundo y es señalado como una planta con gran importancia para el tratamiento de diversas afecciones respiratorias [3], sin embargo, sus aplicaciones han llamado la atención para estudios mutagénicos, así mismo, se han identificado en la planta diversos metabolitos secundarios presentes en hojas, flores y tallos cuya actividad es anticancerígena [4]. La estructura y naturaleza química de esta planta le confiere capacidad antioxidante, la cual se le atribuye un efecto importante sobre la prevención de enfermedades, entre ellas el cáncer. Es por ello, que el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antioxidante y citotóxica del extracto de Acetato de etilo hoja de *Gnaphalium viscosum* (Kunth), para esta última prueba se empleó la línea celular Mda (cáncer de mama).

La efectividad farmacológica que poseen las plantas se debe principalmente al contenido de compuestos bioactivos, fitoquímicos o quimiopreventores, estos son moléculas que tienen una actividad biológica, que se traduce en beneficios para la salud [5], [6] los cuales ejercen sus efectos una vez que ha sido ingeridos o aplicados en infusiones, cataplasmas y otras preparaciones [7], [8].

Dados los antecedentes biológicos que posee la planta de estudio, se dice que el extracto Acetato de etilo de las hojas de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) tiene actividad antioxidante y presenta efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama Mda.

Existe muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy usado se basa en la estabilidad del radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm . Se utilizó este método debido a que su uso es muy flexible en diferente medios, tanto acuosos como lipofílicos.

Otro método es el ABTS se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. La ventaja de usar este método es que se pueden utilizar muestras hidrosolubles como liposolubles, y se puede elegir el solvente apropiado para diversos casos.
El método más usado para la evaluación del efecto citotóxico es mediante el ensayo MTT, este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por enzimas mitocondriales de las células viables, succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Se utilizó este método dado a su eficiencia para medir supervivencia y proliferación celular.

Los resultados de este trabajo son positivos en ambas pruebas, con ello, se da evidencia de la actividad antioxidante y citotóxica de la planta *Gnaphalium viscosum* (Kunth), sobre la línea celular Mda; el efecto anticancerígeno que posee esta planta derivaa que sea candidata para poder tener aplicaciones clínicas para combatir el cáncer. Cabe destacar que el presente trabajo es el primer estudio de análisis antioxidante y citotóxico que se realiza en la especie *Gnaphalium viscosum* (Kunth), lo cual es una gran contribución para la medicina tradicional mexicana, así como para dar a conocer una nueva alternativa natural para el tratamiento de cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se analizó el extracto de acetato de etilo de las hojas de *Gnaphalium viscosum* (Kunth), evaluando su actividad antioxidante empleando los métodos ABTS y DPPH, así como también se evaluó su efecto citotóxico en la línea celular maligna humana Mda empleando el método de MTT, estableciendo la dosis inhibitoria media (DI_{50}) del extracto.

Colecta y conservación de la planta

La realización de la colecta se llevó acabo en el rancho El Guajolote situado en el Municipio de Epazoyucan en el Estado de Hidalgo. Se tomaron únicamente las hojas de la planta, los ejemplares fueron colectados en su tiempo de floración. Se secaron las hojas por 20 días, posteriormente se trituraron en un molino eléctrico; para su conservación se emplearon bolsas de plástico etiquetadas y selladas herméticamente para evitar la humedad, hasta su uso.

Obtención del extracto

Se tomaron 500 g de las hojas de la planta, posteriormente cada parte se sometió a extracciones sucesivas con Acetato de etilo durante una semana a temperatura ambiente, después de este periodo, el extracto fue filtrado y concentrado en rotaevaporador hasta eliminar el solvente. El extracto obtenido se almacenó en frasco y se llevó a refrigeración.

Preparación del extracto

Para cada experimento se pesaron 0.1 g del material vegetal, posteriormente los extractos fueron disueltos en Dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración de 1mL, por cada 200 µL adicionados de DMSO la muestra se llevó a agitación por un tiempo 10 min. Una vez obtenido el extracto, se prosiguió a realizar los cálculos para las concentraciones empleadas en los ensayos. Posteriormente, los extractos fueron diluidos en Medio de cultivo completo (MCC), el cual contenía: medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle médium (DMEM) suero fetal bovino (SFB) al 10%, y antibióticos (estreptomicina y penicilina G sódica) al 1%.

Obtención de las líneas celulares

Las línea célula maligna Mda (cáncer de mama) fue proporcionada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Bioensayo de actividad citotóxica

Las línea celular Mda fue descongelada y transferida a cajas Petri (P 50 y P 100), provista con 10 mL de medio de cultivo Dulbecco modified Eagle médium (DMEM) alto en glucosa suplementando con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibióticos (estreptomicina y penicilina G sódica) al 1%, lo sucesivo es referido como medio de cultivo completo (MCC), posteriormente las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 7% de humedad.

Determinación de viabilidad celular

El Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) fue usado para determinar la viabilidad de la línea celular. El ensayo MTT está basado en la reducción de la sal de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a un colorante forma insoluble, formado por las enzimas mitocondriales en células viables [9].

La línea celular Mda fue cultivada en microplaca de 96 pozos en donde a cada pozo se administraron 1.0 X 10^4 células en 200 µL en medio completo, se dejaron en incubación por 24 h, se eliminó el medio e cultivo y se agregaron las diferentes concentraciones de extracto acetato de etilo de *G. viscosum* (Kunth) a probar (0, 100, 250, 500,750, 1000 µg/mL). Después de 24 h de incubación, el extracto es eliminado y se le adicionó 10 µL de MTT (5 mg/ en PBS) mezclado con medio de cultivo completo, se dejó reaccionar en incubación esto durante un periodo de 3 h, posteriormente se extrajo el medio con el MTT; a cada pozo se le agregó 100 µL de Dimetil sulfóxido (DMSO) se dejó en agitación orbital durante 10 min a temperatura ambiente para disolver el colorante; una vez transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro para microplacas.

Actividad antioxidante

Método ABTS. De acuerdo a la metodología desarrollada, el radical ABTS•+ se obtiene tras la reacción de ABTS [10]. Para esta prueba se utilizaron extractos orgánicos de *G. viscosum* (Kunth).

El ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) se preparó 24 h previas a su uso a una concentración de 3.6 mg/mL conteniendo persulfato de potasio a 0.6 m/mL en etanol Para la curva de calibración se preparó Trolox, a 100 µg/mL en etanol. Posteriormente, se diluye el ABTS en etanol hasta llevarlo a una absorbancia de 0.70±0.02 a una longitud de onda de 734 nm.
Para la preparación de la muestra se pesaron 10 mg del extracto de *G. viscosum* (Kunth) y se le agregaron 1000 µL de etanol, posteriormente se llevó a agitación por 30 min. En un tubo eppendorf. Se tomaron 100 µL de muestra y después se le agregaron 900 µL de ABTS; se deja reposar en la oscuridad por 5 min y finalmente se lleva a lector de microplacas a 734 nm.

Método DPPH. Esta prueba está basada en la reducción del radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) como estándares [11]. Se preparó Trolox a 100µg/mL, para realizar curva de calibración. Se prosiguió a preparar el DPPH a una concentración de 7.5%.

Se pesaron 10 mg del extracto de *G. viscosum* (Kunth) y se le agregaron 1000 µL de etanol, posteriormente se llevó a agitación por 30 min. En un tubo eppendorf se agregaron 100 µL de muestra y después se le agrega 900 µL de DPPH; se deja reposar en la oscuridad por 60 min y finalmente se lleva a lector de micro placas a 520 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos del extracto de acetato de etilo hoja de *Gnaphalium viscosum* (Kunth). Se observó que el extracto posee efecto citotóxico sobre la línea Mda, así mismo se obtuvo que este extracto tiene actividad antioxidante, ya que capturó los radicales libres ABTS y DPPH. Para evaluar la actividad antioxidante se utilizaron los métodos ABTS y DPPH, cada análisis se efectuó por triplicado, expresándose la Actividad antioxidante en porcentaje (%AA) en equivalentes de Trolox. Los extractos vegetales se consideraron activos en este ensayo si el porcentaje de actividad era igual o superior al 25%.

Para realizar comparaciones de porcentaje de captación de radicales libres se requirió de unificar unidades para lo cual fue utilizado el Trolox.

Como se puede apreciar en la figura 1 el extracto acetato de etilo tuvo una capacidad antioxidante de 89.50% sobre el radical ABTS, mientras que para el radical DPPH fue de 81.74%

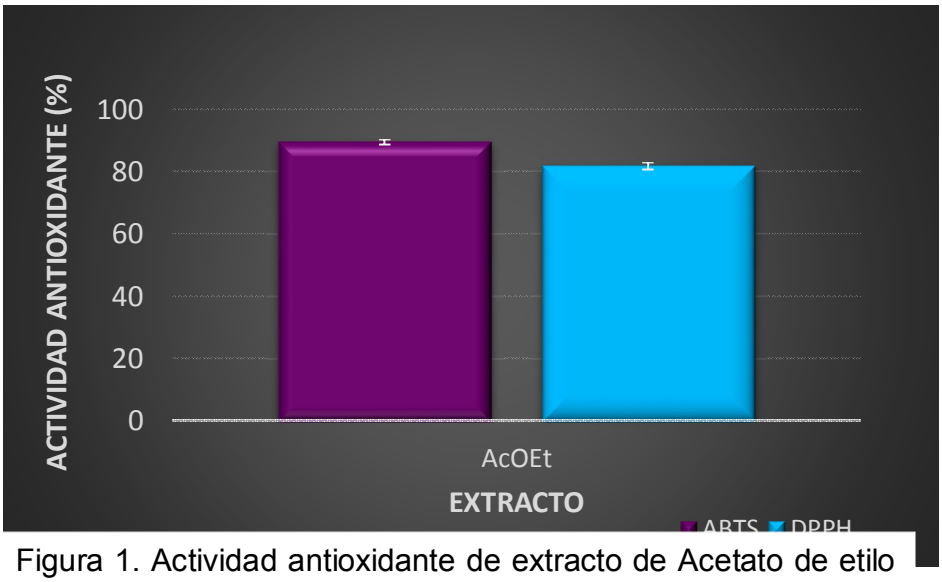


Figura 1. Actividad antioxidante de extracto de Acetato de etilo hoja de *Gnaphalium viscosum (Kunth).* Los resultados son el promedio de tres pruebas independientes ± desviación estándar.

Los resultados de actividad antioxidante obtenidos muestran que el extracto de acetato de etilo hoja presentó mayor inhibición en el radical ABTS lo que sugiere que en la prueba de ABTS presenta una actividad antioxidante mayor que la obtenida por la prueba DPPH. Estos resultados son similares en un estudio realizado en especies pertenecientes a la familia Asteraceae, donde obtuvieron actividad antioxidante prominente en los extractos metanólicos a través del ensayo ABTS [12].

Los porcentajes de actividad antioxidante en este trabajo fueron mayores en comparación al estudio realizado con extractos de diclorometano de *Topobea cf discolor* y *Clusia multiflora*, donde obtuvieron porcentajes de 45,83% y 42,80% respectivamente [13]. Aunque en ambos trabajos se utilizaron los métodos ABTS y DPPH los resultados fueron diferentes esto debido a que se emplearon plantas de diferente especie y familia, así como diferente disolvente y entre otros factores externos.

Para evaluar la actividad citotóxica se utilizó el método MTT y se determinó la dosis inhibitoria 50 realizando una curva-dosis-respuesta (Concentración de extracto vs porcentaje de viabilidad celular) que equivale a una disminución del 50% de la viabilidad celular (DI_{50}). Para el análisis de datos, se ocupó el programa Microsoft Excel 2013.

En el resultado de citotóxicidad presentado en la figura 2 se observó que el extracto de acetato de etilo hoja de *G. viscosum* (Kunth) tuvo un efecto citotóxico sobre la línea celular Mda, ya que se obtuvo una DI_{50} de 250 µg/ mL. Sin embargo, en un estudio donde evaluaron la citotoxicidad del extracto etanólico

de raíces de *Gnaphalium spicatum, s*e observó que el extracto era activo en la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama) presentando una DI_{50} de 98 µg/mL [14] dicho extracto fue casi 3 veces más citotóxico que el empleado en este estudio, a pesar de que son el mismo género de planta, se obtuvo diferencia en el resultado, principalmente se puede deber a que se utilizó otro tipo de disolvente y parte morfológica diferente. Por otra parte se observó que a la concentración más baja probada de 100 µg/ML de extracto acetato de etilo, la viabilidad decrece a un 68.59%, al llegar a la concentración 500 µg/ML la viabilidad se reduce hasta un 30.00 %, decreciendo considerablemente hasta la concentración máxima proba de 1000 µg/mL donde hay una gran inhibición en la viabilidad celular del 88.74%, en la curva se observa que la viabilidad va decreciendo, por lo que habría una considerable inhibición en el porcentaje de viabilidad si se aumentara la concentración de extracto, lo cual confirma la influencia de las concentraciones sobre la viabilidad celular. Sin embargo, hay que destacar que al aplicar dosis más altas de extracto implica problemas de solubilidad, lo que deriva en aumentar las concentraciones DMSO, el cual podría alcanzar concentraciones altas que son toxicas para las células, así mismo, las células al ser expuestas a concentraciones altas de metabolitos secundarios estos promueven mutaciones celulares, lo cual ocasiona que estas sigan proliferando aun en presencia de dichos compuestos [15], [16].

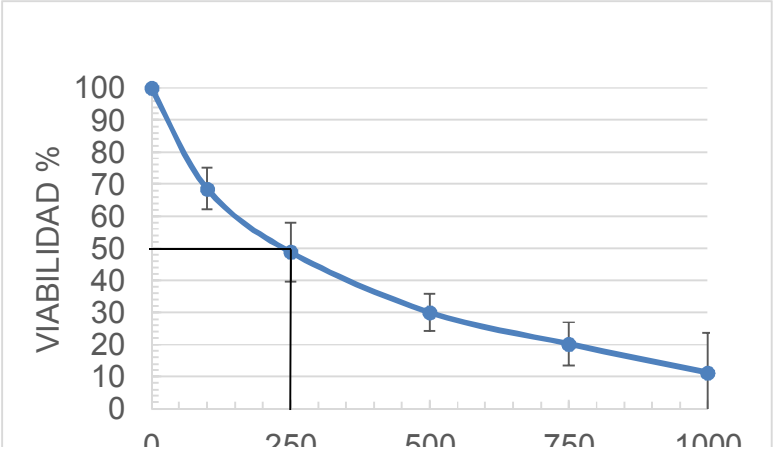


Figura 2. Efecto Citotóxico del extracto de hoja de acetato de etilo de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre la línea celular Mda. Los resultados que se muestran, son ensayos independientes de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar de cada concentración probada, así mismo, se señala la DI_{50} del extracto probado.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que el extracto acetato de etilo hoja de *G. viscosum* (Kunth) presentó mayor inhibición en el radical ABTS que el radical DPPH, siendo un extracto con gran actividad antioxidante; por otra parte dicho extracto mostró una gran actividad citotóxica, ya que a la concentración máxima probada de extracto se logró inhibir 88.74 % de la viabilidad celular. Dada a su gran actividad antioxidante y citotóxica esta planta es candidata para poder emplearla como alternativa medicinal natural contra el cáncer.

REFERENCIAS

[1] Secretaria de salud. INFORMACIÓN ESTADÍSTICA. 2015. Última modificación: Lunes, 13 de Febrero de 2017.www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacionestadistica

[2] V.S. Parmar, M.E. Bracke, J. Philippe, J. Wengel, S.C. Jain, C.E. Olsen, K.S. Bisht, N.K. Sharma, A. Courtens, S.K. Sharma, K. Vennekens, V. Van Marck, S.K. Singh, N. Kumar, A. Kumar, S. Malhotra, R. Kumar, V.K. Rajwanshi, R. Jain, M.M. Mareel, "Anti-invasive activity of alkaloids and polyphenolics in vitro". Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 5, no. 8, pp. 1609-19, 1997.

[3] J.Cebrián, "Diccionario Integral de Plantas Medicinales". 1ra edición. Integral. Barcelona. Cell. Vol. 5, pp. 646-674, 2002

[4] M. Déciga-Campos, I. Rivero-Cruz, M. Arriaga-Alba, G. Castañeda-Corral, G.E. Ángeles-López, A. Navarrete, R. Mata, "Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine", J. Ethnopharmacol, vol. 110, pp 334-342, 2007.

[5] K. Narayama, R. Reddy, M. Sripal, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna, "Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial", Indian Journal of Pharmacology, vol. 33, pp. 2-16

[6] S.C. Paladino & C.A. Zuritz, "Antioxidant grape seeed (Vitis vinifera L.) extracts efficiency of different solvents on the extraction process", Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, vol. 43, no.1, pp.187-199, 2011.

[7] L.E. Estrada, "Plantas Medicinales de México 2a.ed", Universidad de Chapingo, México, pp. 580, 1995.

[8] M.F. Balandrin, J.A. Klocke, E. Wurtele, W.H. Bollinger, "Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials", Science, vol. 228, pp. 1154-1160, 1985.

[9] T. Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", J. Immunol. Met, vol. 65, pp. 55-63, 1983.

[10] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine", Biol. Med, vol. 26, no. 9, pp. 1231-1237, 1999.

[11] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity", Lebensm. Wiss, Technol, vol. 22, pp. 25-30, 1995.

[12] A. Gaviria, C.E. Correa, O.M. Mosquera, J. Niño, Y.M. Correa, "Evaluación de las actividades antioxidante y antitopoisomerasa de extractos de plantas de la ecorregión cafetera colombiana", *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, vol.11, no.1, pp. 86-101, 2015.

[13] J. Tovar del Río, "*Determinacion de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera"* (Bachelor's thesis, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira), 2013.

[14] D. Callacondo-Riva, A. Quispe-Mauricio, S. Lindo-Gamarra, A.J. Vaisberg, "Actividad citotóxica del extracto etanólico de Gnaphalium spicatum "keto keto" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas", vol. 25, no.4, pp. 380-85, 2008.

[15] P. Stanley, J.P. Carver, "Lectin receptors and lectin resistance in chinese hamster ovary cells", Adu. Exp. Med.Biol, vol. 84, pp. 265-284, 1977.

[16] C. Valadez-Vega, J.A. Morales-González, M.T. Sumaya-Martínez, L. Delgado-Olivares, A. Cruz-Castañeda, M. Bautista, C. Zuñiga-Pérez, "Cytotoxic and antiproliferative effect of tepary bean lectins on C33-A, MCF-7, SKNSH, and SW480 cell lines", *Molecules*, vol. 19. no. 7, pp. 9610-9627, 2014.

LIBERACIÓN CONTROLADA DE AMOXICILINA A PARTIR DE HIDROGELES POLÍMERICOS.

[1*]Torres-Figueroa, A.V., [1]Pérez-Martínez, C.J., [2]Del Castillo-Castro, T., [1]Corella-Madueño, M.A.G. y [1]Bolado-Martínez, E.

1. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.
2. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Apdo. Postal 130, Hermosillo, Sonora 83000, México.

*Autor para correspondencia: anavaleria.torresf@gmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

Los hidrogeles son redes poliméricas compatibles con el agua, los cuales pueden aumentar varias veces su volumen sin perder su forma. Las aplicaciones de este tipo de materiales dependen de su grado de hinchamiento máximo y de las propiedades mecánicas que presentan, como: la porosidad y densidad de entrecruzamiento, su grado de flexibilidad muy similar al del tejido natural, por lo cual constituyen un grupo muy importante en la industria farmacéutica para aplicaciones biomédicas, como sistemas de liberación controlada de medicamentos [1]. Estos sistemas tienen como ventajas, la posibilidad de administrar el fármaco en órganos blancos específicos, la garantía de la continuidad del tratamiento por la noche, la estabilidad del fármaco y su óptima absorción por los tejidos vivos, así como la disminución de efectos secundarios [2]. Debido a la importancia de estos sistemas, el objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad de liberación de amoxicilina desde hidrogeles poliméricos, por lo cual se describen las síntesis de redes semi-interpenetradas de Poliacrilamida/almidón a diferentes composiciones (100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50) evaluando su capacidad de hinchamiento y el efecto de la concentración de ambos polímeros sobre la cinética de liberación del fármaco bajo condiciones fisiológicas normales.

Palabras clave: Amoxicilina; redes semi-interpenetradas; Poli (acrilamida); Almidón.

REFERENCIAS

[1] J.L. Escobar, D.M. García, A. Valerino, D. Zaldivar e Issa Katime. Influencia de la temperatura y la composición en el proceso de hinchamiento en hidrogeles de poli-(n-isopropilacrilamidaco-n,n dimetilacrilamida). 2001.

[2] D. E. Rodríguez-Félix, C. J. Pérez-Martínez, M. M. Castillo-Ortega, M. Pérez-Tello, J. Romero-García, A. S. Ledezma-Pérez, T. Del Castillo-Castro, F. Rodríguez-Félix. pH- and temperature-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels composed of poly(acrylamide) and poly(c-glutamic acid) as amoxicillin controlled-release system. 2011.

MODIFICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA YA EXISTENTE DE OBTENCIÓN DE B-LACTOSA PARA AUMENTAR SU GRADO DE PUREZA.

[1,2]López-Pablos, A.L., [1]Silva-Cázares, M.B., [3]López-Martínez, L.A., [3]Martínez-Juárez, L.G., [4]Leyva-Porras, C.C., y [1]*Saavedra-Leos, M.Z.

1. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano, Carretera a Cedral km. 5+600, Ejido San José de las Trojes, Matehuala, S.L.P., C.P. 78700, México.
2. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales (DICIM), Sierra Leona 530, Col. Lomas, 2a. Sección, Planta Baja, San Luis Potosí, S.L.P, México.
3. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano Oeste, Carretera Salinas-Santo Domingo # 200, C.P. 78600 Tel. +52(496)963.4030 Salinas de Hidalgo, S.L.P México.
4. Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV), Miguel de Cervantes # 120, Complejo Industrial Chihuahua. C.P. 31109 Chihuahua, Chih., México.

*Autor para correspondencia: zenaida.saavedra@uaslp.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
La lactosa puede cristalizar en diferentes formas: α-lactosa monohidratada, β-lactosa anhidra, α-lactosa anhidra higroscópica inestable y α-lactosa anhidra estable. De éstas, la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra son las más utilizadas como excipientes en la industria farmacéutica, debido a la gran estabilidad termodinámica que presentan. Comercialmente, la α-lactosa monohidratada puede encontrarse con niveles de pureza mayores o iguales al 99%; por otro lado, la β-lactosa anhidra no está disponible como una fase única, ya que usualmente es una mezcla de β-lactosa anhidra y α-lactosa anhidra estable, normalmente en una proporción 60β:40α. Aunado a esto, una gran cantidad de investigadores han realizado trabajos encaminados a la obtención de una metodología de producción de este polimorfo con una pureza mayor a la comercial. El porcentaje de pureza más alto de β-lactosa anhidra obtenido hasta la fecha ha sido el logrado por la metodología de Olano y Ríos en 1978, quienes lograron la obtención de este polimorfo con un rendimiento de aproximadamente el 94%. Por lo que, en este trabajo de investigación, se llevó a cabo la modificación de esta metodología, consiguiendo la obtención de una β-lactosa anhidra con un porcentaje de pureza del 100%, lo cual no se había logrado anteriormente.

Palabras clave: β-lactosa; pureza; metodología.

INTRODUCCIÓN
La lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranosa), conocida también como el azúcar de la leche, es un disacárido constituido por una molécula de D-galactosa y otra de D-glucosa, unidas mediante un enlace glucosídico β (1,4) [1]. Existe en los estereoisómeros α y β, los cuales difieren en el arreglo espacial del grupo hidroxilo en el carbono 1 del grupo hemiacetal [2,3]. En solución, la tasa de transformación entre los anómeros α y β es llamada mutarrotación, y es dependiente de la temperatura y el pH [4,5].

En estado sólido, la lactosa puede ser encontrada en forma amorfa, cristalina o una mezcla de ambas. En la lactosa amorfa las moléculas no están ordenadas de acuerdo a un patrón regular y es una mezcla de moléculas de α- y β-lactosa. Tiene un alto estado de energía, comparada con la lactosa cristalina, por lo que es termodinámicamente inestable. La lactosa amorfa se obtiene cuando una solución se seca rápidamente, tal como en el secado por aspersión o la liofilización; aunque también puede formarse mediante procesos mecánicos, como la molienda [5,6]. Por otro lado, la lactosa cristalina presenta una estructura muy ordenada y la forma exacta del cristal depende de las condiciones del proceso de cristalización. Ésta puede cristalizar en diferentes formas, es decir, presenta polimorfismo [1,7]. Existen cuatro formas polimórficas reconocidas de la lactosa, que consisten en una forma hidratada: α-lactosa monohidratada; y tres anhidras: β-lactosa anhidra, α-lactosa anhidra higroscópica inestable y α-lactosa anhidra estable [7,8,9].

Actualmente, sólo la α-lactosa monohidratada y la β-lactosa anhidra son producidas de manera comercial. La α-lactosa monohidratada es la única forma disponible en una sola fase (libre del anómero β-) por lo que gran parte de las investigaciones relacionadas con la caracterización de la lactosa han sido sobre este polimorfo. En cambio, la β-lactosa anhidra sólo puede ser encontrada comercialmente como una mezcla de β-lactosa anhidra y α-lactosa anhidra estable, normalmente en una proporción 60β:40α [7]. Las versiones más puras pueden contener alrededor de un 85% del anómero β- y el resto de α-lactosa monohidratada o α-lactosa anhidra [10].

Una gran cantidad de trabajos han sido encaminados al establecimiento de una metodología de purificación de la β-lactosa anhidra con el fin de obtener una muestra policristalina monofásica (totalmente libre del anómero α-); sin embargo, todos ellos han dado como resultado la producción de cristales con más de una fase que contienen a este polimorfo en porcentajes no mayores al 98%. Por ejemplo, en el procedimiento descrito por Parrish y colaboradores en 1979 [11], se utilizaron α-lactosa monohidratada, octaacetato de α-lactosa y octaacetato de β-lactosa como reactivos iniciales, los cuales se pusieron en contacto (cada uno) con soluciones metanólicas de metóxido de potasio. Las reacciones de conversión se llevaron a cabo a dos temperaturas, ambiente y de ebullición (alrededor de 65°C), en tiempos que oscilaban entre las 0.5 horas a las 24 horas. Al analizar las muestras resultantes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), se determinó que la más pura contenía un 98% de β-lactosa, obtenida al poner en contacto α-lactosa monohidratada, como reactivo inicial, con una solución 0.014M de metóxido de potasio en metanol, durante 2 horas y a una temperatura de reflujo. Sin embargo, estos autores no mencionan con claridad si el producto obtenido es cristalino o amorfo, y tampoco presentan los difractogramas que determinan la estructura del estado sólido de su muestra. Por otro lado, Olano y Ríos, en 1978 [12], estudiaron la producción de β-lactosa anhidra a partir de α-lactosa monohidratada, utilizando soluciones alcohólicas de hidróxido de sodio en metanol. En sus experimentos probaron el efecto de diversos factores sobre la reacción de conversión, como la temperatura (ambiente y de ebullición), la concentración de las soluciones alcohólicas, la humedad en el metanol utilizado, así como la proporción de α-lactosa monohidratada y solución alcohólica. Determinaron que la mayor conversión fue lograda a temperatura ambiente y después de 10 horas de reacción con agitación constante, utilizando una proporción 1:10 de α-lactosa monohidratada y una solución al 0.2% de hidróxido de sodio en metanol anhidro, respectivamente. El producto obtenido bajo estas condiciones fue analizado mediante cromatografía de gas-líquido y se determinó que contenía un 93.6% de β-lactosa. No obstante,

estos autores no analizaron sus muestras mediante Rayos X para determinar si efectivamente se trataba de lactosa cristalina.

Las metodologías establecidas por Parrish y colaboradores, así como la de Olano y Ríos, 1978, son las que mayor éxito han tenido en cuanto a la obtención de una β-lactosa con alto grado de pureza; no obstante, sus resultados no son suficientes para demostrar que efectivamente obtuvieron al polimorfo en la pureza que ellos manifiestan, ya que carecen del análisis de sus muestras mediante técnicas que determinan la estructura del estado sólido, como la de Rayos X (XRD). Parrish y colaboradores, mencionan en sus resultados el uso de esta técnica, sin embargo, no muestran los difractogramas y tampoco hacen una descripción de los mismos. Por otro lado, Olano y Ríos dicen haber obtenido al polimorfo en una pureza que sobrepasa el 90%; no obstante, la técnica que utilizaron para establecerlo fue la de cromatografía gas-líquido, la cual sólo cuantifica la proporción del anómero (α-β), más no la de los polimorfos presentes en la muestra, es decir, es una técnica que no determina la estructura del estado sólido. Por esa razón, en el presente trabajo de investigación se escogió una de las metodologías establecida por los autores anteriores: la de Olano y Ríos, por ser la más sencilla y obtener los máximos rendimientos a temperaturas ambientales, con el fin de mejorarla y lograr la producción de una β-lactosa anhidra con una pureza mayor a las obtenidas anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó α-lactosa monohidratada con una pureza ≥ 99% marca Sigma, para la obtención de la β-lactosa anhidra. Para la preparación de la solución alcohólica de sal inorgánica se empleó Hidróxido de sodio (NaOH) marca MACRON y Metanol (CH_3OH) marca Sigma-Aldrich, grado HPLC, con una pureza ≥ 99.9%.

La metodología del presente trabajo de investigación se describe en los siguientes puntos.

Análisis de la metodología de Olano y Ríos y puesta a punto de la técnica.

La metodología de Olano y Ríos, 1978, así como las condiciones de experimentación de la misma, se describen a continuación de manera general:

1. Preparar una solución alcohólica al 0.2% de hidróxido de sodio utilizando metanol como solvente.
2. Poner en contacto la α-lactosa monohidratada y la solución alcohólica, en una proporción 1:10, durante 10 horas, a temperatura ambiente (25°C) y con agitación, para lograr la conversión máxima a β-lactosa anhidra.
3. Filtrar la mezcla de α-lactosa monohidratada y solución alcohólica.
4. Poner a secar el polvo retenido en el filtro, con vacío y a temperatura ambiente, durante dos horas.

Con base en esta metodología se realizaron 5 ensayos, variando algunos parámetros de la misma, como la temperatura, el tiempo de contacto del polvo de α-lactosa monohidratada con la solución alcohólica de base inorgánica, la agitación de los lotes y el modo de secado de los polvos. Las condiciones experimentales de estos ensayos, así como las de la metodología de Olano y Ríos, 1978, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. *Condiciones experimentales de los ensayos realizados y de la metodología de Olano y Ríos, 1978.*

Ensayo	Reactivos de la solución alcohólica	Concentración de la solución alcohólica (%)	Proporción de la suspensión ($L_{\alpha.H2O}$: solución alcohólica)	Temperatura del ensayo (°C)	Tiempo de contacto (h)	Agitación	Secado	
							Tiempo	Vacío
1	NaOH y CH_3OH	0.2	1:10	64.7[a]	1.5	Constante	1 semana	No
2	NaOH y CH_3OH	0.2	1:10	Ambiente[b]	72	Nula	1 semana	No
3	NaOH y CH_3OH	0.2	1:10	50 a 55	1.5	Nula	1 semana	No
4	NaOH y CH_3OH	0.2	1:10	24 a 29	15	Constante	1 semana	No
5	NaOH y CH_3OH	0.2	1:10	26, 29 y 32[c]	72	Nula	1 semana	No
OR[d]	NaOH y CH_3OH	0.2	1:10	25	10	Constante	2 horas	Si

a Temperatura de ebullición del metanol.
b Temperatura ambiental no registrada.
c Temperatura controlada con incubadora.
d Metodología de Olano y Ríos, 1978.

En los ensayos 1 al 4 se manejó, en cada uno, sólo un lote de 40 g de α-lactosa monohidratada con 489.5 mL de solución alcohólica, que equivale a una proporción 1:10, lactosa:solución alcohólica. En el ensayo 5, se manejaron tres lotes, con las mismas cantidades y proporciones que en los otros ensayos. En los ensayos 1 y 3, la mezcla de α-lactosa monohidratada y la solución alcohólica fue reflujada; en los ensayos 2 y 4, fue mantenida a temperatura ambiente, y en el ensayo 5, cada uno de los tres lotes estuvieron a diferentes temperaturas: 26°C, 29°C y 32°C, respectivamente. Los polvos obtenidos al filtrar, en todos los ensayos, fueron colocados en un desecador por una semana a temperatura ambiente. Sólo en los ensayos 1 y 4, la mezcla de α-lactosa monohidratada y solución alcohólica se mantuvo con agitación constante; en el resto de los ensayos, la agitación fue nula.

Caracterización térmica por DSC.

Se caracterizaron térmicamente los polvos obtenidos en cada uno de los cinco ensayos experimentales, empleando la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), para dilucidar la presencia de β-lactosa anhidra en las muestras analizadas, mediante el establecimiento de parámetros termodinámicos, como la entalpía (ΔH) y la capacidad calorífica (Cp).

Las muestras se pesaron en un rango de 5 a 10 mg y se utilizaron celdas de aluminio Tzero® (TA Instruments) para ser analizadas en un equipo DSC Q200 (TA Instruments, U.S.A.), equipado con un sistema de enfriamiento RCS90, para efectuar el análisis en un rango de temperatura de -90 a 550°C,

con precisión y sensibilidad de ±0.1°C y ±0.2 µW. La línea base fue calibrada con Indio (156.60°C, 28.47 J/g) y la capacidad calorífica, con zafiros. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Caracterización por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).
Una vez realizada la caracterización térmica de los polvos, la muestra a 29°C del ensayo 5 fue sometida a un análisis de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), con el fin de corroborar la presencia de β-lactosa anhidra en la misma. El análisis fue realizado en un espectrofotómetro de infrarrojo marca Thermo, modelo Nicolet iS50 FTIR, empleando su accesorio Smart Orbit de reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante. Para la interpretación de los espectros se usó el software Omnic 9.3.32., que fueron adquiridos en un intervalo de 4000 a 600 cm^{-1}, con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos por análisis. Antes de cada análisis se registró la lectura de un blanco correspondiente al portamuestras sin muestra.

Caracterización mediante Rayos X (XRD).
Se sometió la muestra a 29°C del ensayo 5 a un análisis para dilucidar la estructura del estado sólido. Para ello, se utilizó un difractómetro de rayos X marca PANalytical, modelo Empyrean, equipado con un detector X'Celerator en una geometría Bragg-Brentano. El barrido de las muestras se realizó en un rango de 2θ de 0° a 100°.

Determinación de la pureza.
Se determinó la pureza de la muestra a 29°C del ensayo 5 utilizando el Método de refinamiento Rietveld, mediante el análisis de dos patrones de difracción de Rayos X (XRD) en el software Xpert HighScore Plus: uno experimental y otro teórico. El patrón experimental utilizado fue el de los parámetros de difracción de los cristales de β-lactosa obtenida en el laboratorio, y el teórico, una base de datos con parámetros de difracción de una mezcla de α-lactosa monohidratada y β-lactosa anhidra, tomada de la librería del software antes mencionado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC).
Primeramente, se realizó la caracterización térmica por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de la α-lactosa monohidratada marca Sigma y de los polvos de los ensayos 1 al 4. Los termogramas de DSC se muestran en la Figura 1. Para la α-lactosa monohidratada, pueden observarse dos eventos térmicos característicos de este polimorfo: uno en aproximadamente 145°C, correspondiente a la evaporación de la molécula de agua, y otro a 220°C, perteneciente a la degradación del compuesto. Este termograma coincide con los obtenidos por Figura y Epple en 1995 y por Brittain y Blaine [13,14], para la α-lactosa monohidratada. Con respecto a los termogramas de los polvos de los ensayos 1, 3 y 4, se observan igualmente los endotermas presentados en la α-lactosa monohidratada, a las mismas temperaturas, lo cual significa que no hubo conversión a β-lactosa anhidra. No obstante, el termograma del ensayo 2 muestra sólo un evento térmico a aproximadamente 235°C, que de acuerdo a estudios realizados por Figura y Epple, 1995, y Brittain y Blaine, corresponde al endoterma característico de la β-lactosa anhidra, el cual pertenece a la degradación térmica de la misma. Con esto se concretó la transformación de α-lactosa monohidratada a β-lactosa anhidra en este ensayo.

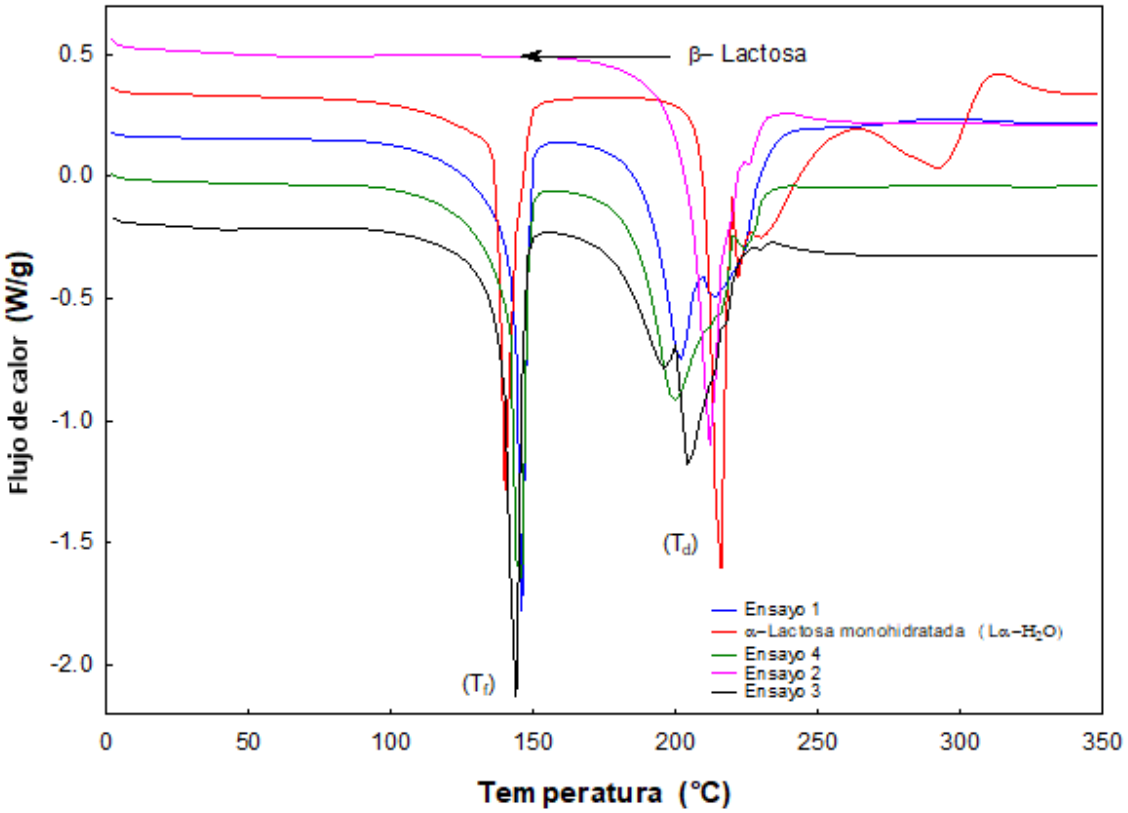


Figura 1. *Termogramas de DSC de la α-Lactosa monohidratada y de las muestras de los ensayos experimentales 1 al 4.*

El termograma del ensayo 2 sirvió para concretar las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo la conversión de α-lactosa monohidratada en β-lactosa anhidra, que fueron: una temperatura ambiente (la cual no se registró, pero estuvo en un rango aproximado de 25 a 29°C), agitación nula, un tiempo de contacto de la α-lactosa monohidratada con la solución alcohólica de entre 1 a 72 horas y secado de los polvos en un desecador a temperatura ambiente. Con el fin de poner a punto la técnica de obtención de β-lactosa, se realizó el ensayo 5, cuyas condiciones experimentales se basaron en las del ensayo 2. En el ensayo 5, tres lotes de proporción 1:10 (α-lactosa monohidratada:solución alcohólica) fueron sometidos a diferentes temperaturas cada uno: 26°C, 29°C y 32°C, por 72 horas. Al final de ese tiempo, fueron filtrados y secados en un desecador por una semana a temperatura ambiente. Finalmente, fueron sometidos a un análisis por DSC y los termogramas resultantes se muestran en la Figura 2. Puede observarse que los termogramas de los ensayos a 26°C y 32°C muestran los endotermas característicos de la α-lactosa monohidratada, lo que significa que no hubo conversión a β-lactosa. Esto no sucede con el termograma a 29°C, en el cual sólo se observa un endoterma aproximadamente a 235°C, característico de la forma β-anhidra. Con estos resultados, se pudo determinar que la temperatura a la cual se llevó a cabo la conversión del 100% fue la de 29°C.

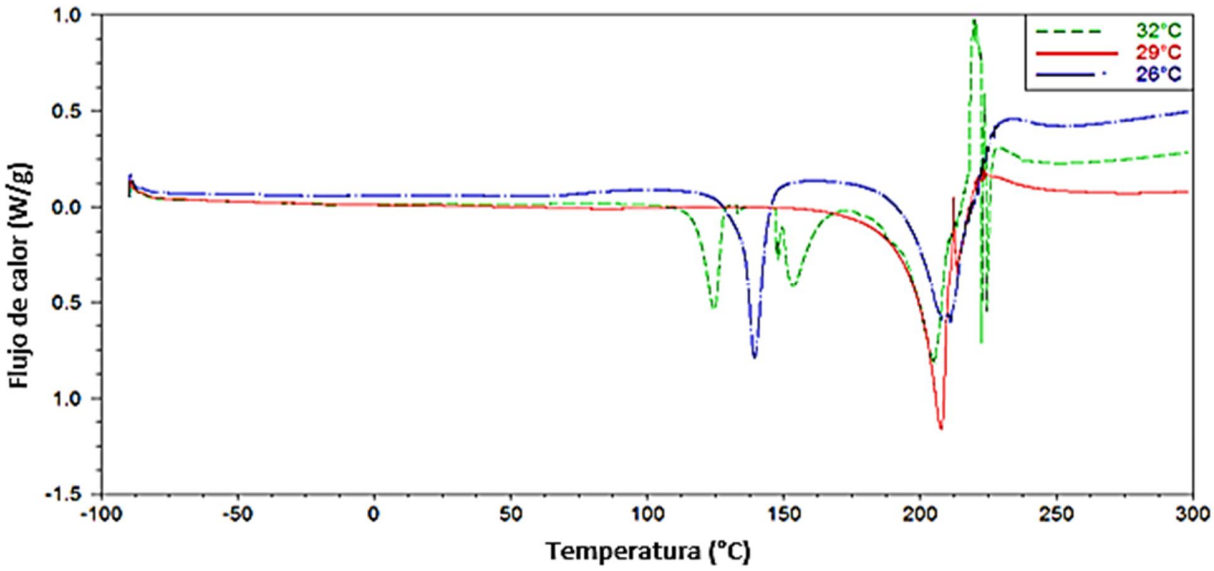


Figura 2. *Termogramas de DSC de las muestras del ensayo 5.*

Espectros de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

Una vez realizado el análisis térmico de los polvos obtenidos en los ensayos 1 al 5, se procedió al análisis de la muestra de 29°C del ensayo 5 por FTIR, que fue en la que se obtuvo la β-lactosa. El espectro resultante se muestra en la Figura 3. En éste se exhibe una banda en 3200 a 3600 cm^{-1}, correspondiente a la vibración de estiramiento simétrico de los grupos hidroxilo, así como la banda en 1070 a 1200 cm^{-1}, perteneciente a la vibración de flexión del enlace glicosídico. La banda característica del anómero β puede observarse a 948 cm^{-1}, la cual coincide con el espectro de IR de este polimorfo, reportado ya anteriormente por otros investigadores, para la β-lactosa anhidra [7,8]. Con este análisis se corrobora la presencia de este polimorfo en la muestra.

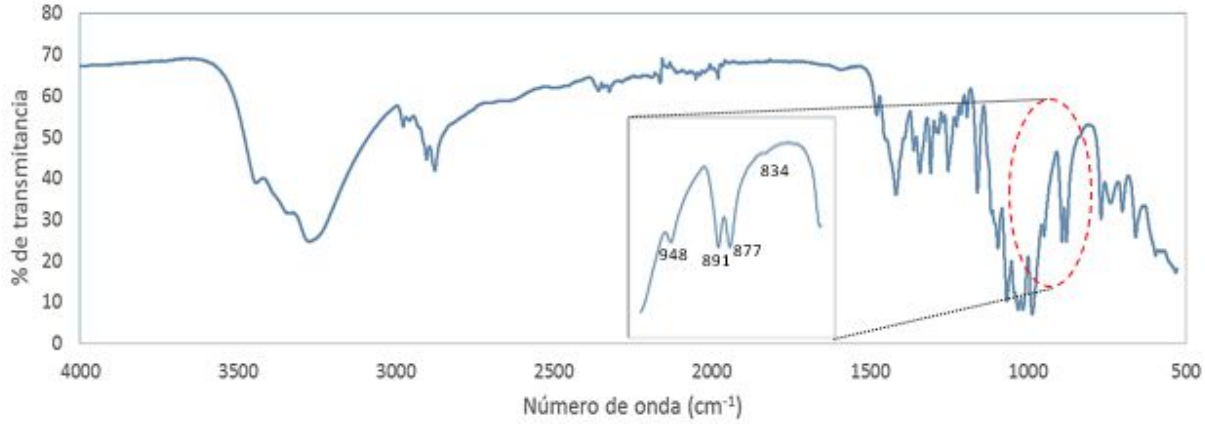


Figura 3. *Espectro de FTIR de la muestra de 29°C del ensayo 5.*

Difractogramas de Rayos X de Polvos (PXRD).

Con el fin de establecer la estructura del estado sólido de la muestra de 29°C del ensayo 5, ésta fue sometida a un análisis de PXRD. El difractograma obtenido se muestra en la Figura 4 y en él se pueden observar claramente picos bien definidos, propios del estado cristalino. El difractograma concuerda con los obtenidos previamente por otros autores, para la β-lactosa anhidra [7,13,27], y el cual exhibe picos característicos de este polimorfo en 10.5°, 18.8-20° y 20.5-21.5°.

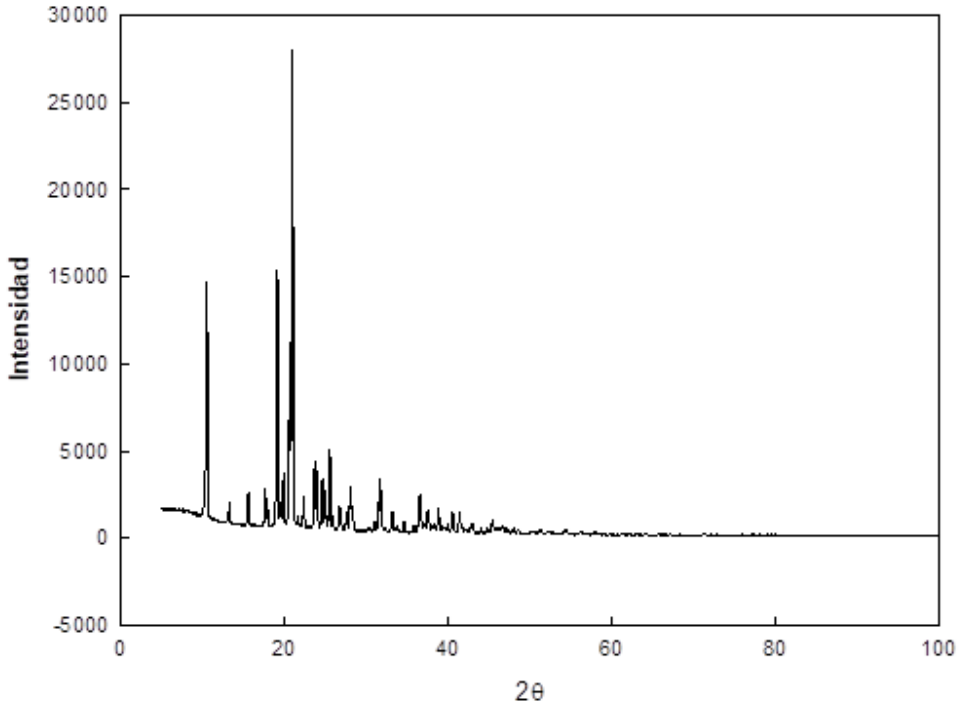


Figura 4. *Difractograma de PXRD de la muestra de 29°C del ensayo 5.*

Pureza de la β-lactosa anhidra obtenida en el laboratorio.

Por último, se sometió la muestra de 29°C del ensayo 5 a un análisis de pureza. Para ello, se comparó el patrón del difractograma de PXRD de la muestra de estudio (patrón experimental), con otro (patrón teórico) contenido en el software Xpert HighScore Plus, mediante el refinamiento de Rietveld. Con los resultados de este refinamiento se estableció que la muestra estaba compuesta de un 100% por β-lactosa anhidra. En la Figura 5 se presentan los difractogramas de ambos patrones (experimental y teórico) y en la Figura 6 se muestra la composición de la muestra analizada en una gráfica de pastel.

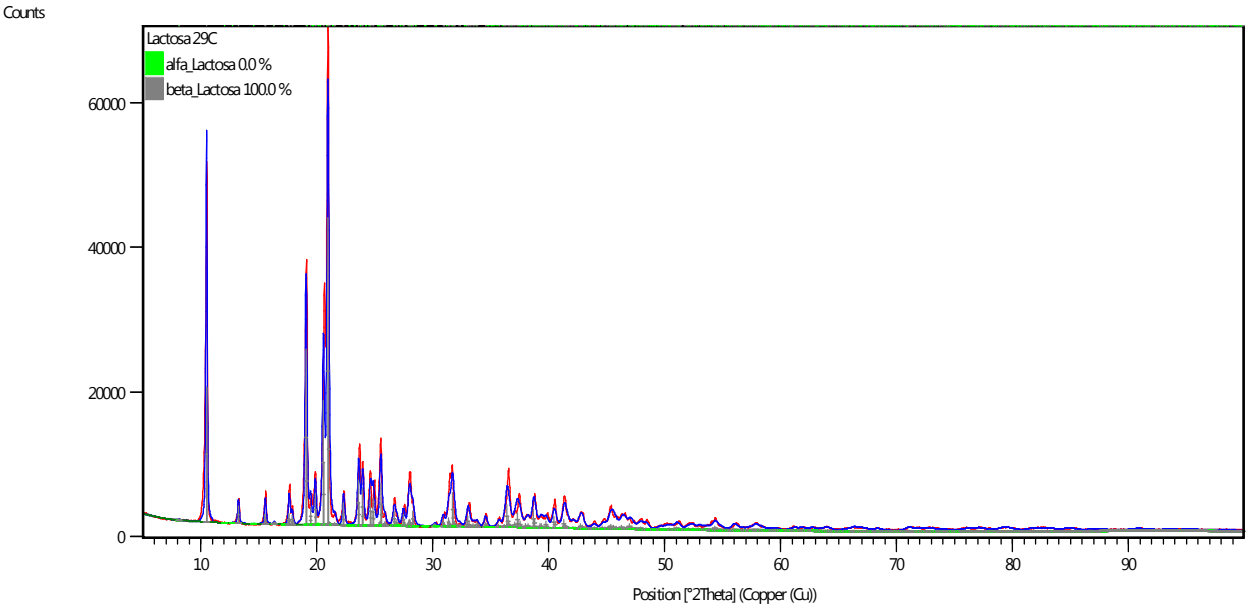


Figura 5. *Difractogramas de los patrones experimental y teórico (Software HighScore Plus).*

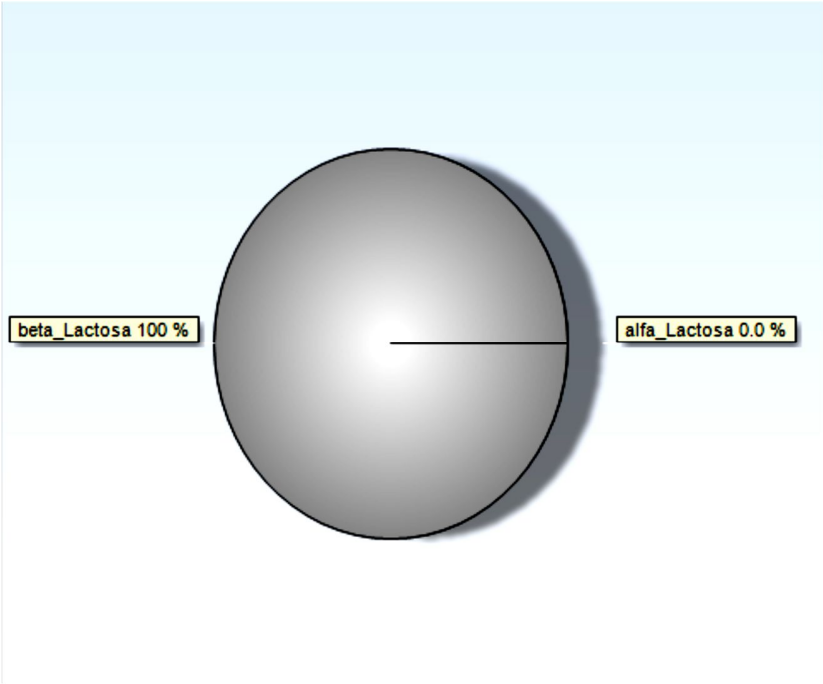


Figura 6. *Porcentaje de β-lactosa anhidra en la muestra de 29°C del ensayo 5.*

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se modificaron algunos parámetros y aspectos de la metodología de Olano y Ríos, 1978, como la temperatura, el tiempo de contacto de la α-lactosa monohidratada con la solución alcohólica, la agitación de los lotes y el modo de secado de los mismos, con el fin de obtener una β-lactosa anhidra con un mayor grado de pureza que las obtenidas por las metodologías ya existentes. Para ello, se realizaron cinco ensayos experimentales, y al analizar mediante diversas técnicas analíticas, como DSC, FTIR y PXRD, las muestras obtenidas en cada uno, se estableció que al poner en contacto el polvo de α-lactosa monohidratada con una solución alcohólica al 0.2% de hidróxido de sodio en metanol, en una proporción 1 a 10 (lactosa:solución alcohólica), sin agitación, durante 72 horas a 29°C y secar el polvo (una vez filtrado) en un desecador por una semana, se obtiene una β-lactosa anhidra con una pureza del 100%. Este resultado no había sido logrado con ninguna de las metodologías de producción ya existentes. Es importante mencionar que, aunque los resultados de esta investigación han sido inéditos, es necesario complementarlos con un análisis de estabilidad de la β-lactosa obtenida. Por lo que, en un trabajo posterior se someterá el polimorfo producido, a diferentes condiciones de humedad y temperatura, y se analizará su comportamiento, con el fin de determinar las condiciones óptimas de su almacenamiento y producción, para así poder garantizar su estabilidad en su uso como excipiente en la elaboración de medicamentos.

REFERENCIAS

[1] M. Carpin, H. Bertelsen, J.K. Bech, R. Jeantet, J. Risbo, and P. Schuck, "Trends in Food Science & Technology Caking of lactose : A critical review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 53, pp. 1–12, 2016.

[2] R. Jawad, C. Elleman, L. Vermeer, A.F. Drake, B. Woodhead, G.P. Martin, and P.G. Royall, "The measurement of the β/α anomer composition within amorphous lactose prepared by spray and freeze drying using a simple 'H-NMR method," *Pharmaceutical Research*, vol. 29, pp. 511-524, 2012.

[3] V.H. Holsinger, "Lactose," in *Fundamentals of dairy chemistry*, N. Wong, R. Jenness, M. Keeney and E. Marth, Ed. Springer: U.S., 1988, pp. 279-342.

[4] S. Badui Dergal, "Química de los alimentos," 4ª edición, Alhambra Mexicana: México, 1986, pp. 373-374.

[5] V.H. Holsinger, "Physical and chemical properties of lactose," *Advanced dairy chemistry,* vol. 3, pp. 1-38, 1997.

[6] H. Newell, G. Buckton, D. Butler, F. Thielmann, and W.R. Daryl, "The use of inverse phase gas chromatography to measure the surface energy of crystalline, amorphous, and recently milled lactose," *Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 5, pp. 662-666, 2001.

[7] J.H. Kirk, S.E. Dann, and C.G. Blatchford, "Lactose: A definitive guide to polymorph determination," *International journal of pharmaceutics*, vol. 334, pp. 103-114, 2007.

[8] Y. Listiohadi, J.A. Hourigan, R.W. Sleigh, and R.J. Steele, "Thermal analysis of amorphous lactose and α-lactose monohydrate," *Dairy Science and Technology*, vol. 89. pp. 43-67, 2009.

[9] S. Ziffels and H. Steckel, "Influence of amorphous content on compactation behavior of anhydrous α-lactose," *International journal of pharmaceutics*, vol. 387, pp. 71-78, 2010.

[10] G.K. Bolhius and K. Zuurman, "Tableting properties of experimental and commercially available lactose granulations for direct compression," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 21, pp. 2057-2071, 1995.

[11] F.W. Parrish, K.D. Ross, and T.D. Simpson, "Formations of β-lactose form α- and β-lactose octaacetates and from α-lactose monohydrates," *Carbohydrate Research*, vol. 71, pp. 322–326, 1979.

[12] A. Olano and J.J. Rios, "Treatment of lactose with alkaline methanolic solution: Production of beta-lactose from alpha-lactose hydrate," *Journal of Dairy Science*, vol. 61. pp. 300-302, 1978.

[13] L.O. Figura and M. Epple, "Anhydrous alpha-lactose: a study with DSC and TXRD," *Journal of Thermal Analysis*, vol. 44. pp. 45–53, 1995.

[14] H.G. Brittain and R.L. Blaine, "α-Monohydrate Phase in Lactose by DSC", TA instruments, U.S., *Base de datos TA 293,* pp. 10–12.

[15] A. Gombás, I. Antal, P. Szabo-Révéz, S. Marton, and I. Eros, "Quantitative determination of cristallinity of alpha-lactose monohydate by Near Infrarred Spectroscipy (NISR)," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 256. pp. 25-32, 2002.

DISTRIBUCION ESPACIAL DE CASOS DE DIABETES MELLITUS EN EL ESTADO DE COLIMA DURANTE EL 2016.

[1]Vargas-Amado, M.E., [2]Barragán-Martínez, Z., [3]Carrasco-Alcántara, D., [1]*Álvarez-Maya, I.

1. Centro de Investigación de Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
Av. Normalistas 800 Colinas de la Normal, 44270. Guadalajara, Jalisco. Tel. (33) 3345 5200
2. CUCSH, Departamento de Geografía y Ordenación Territorial, Calle Guanajuato 1045, Artesanos, 44260 Guadalajara, Jal. Teléfono 33 14885170
3. Secretaría de Salud y Bienestar Social Colima Av. Liceo de Varones Esq. Dr. Rubén Agüero, Col. La Esperanza, CP 28000, Colima, Colima. Teléfono (312) 31 622 24

*Autor para correspondencia: Ikuri.alvarez@gmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
En la actualidad la Diabetes Mellitus es una enfermedad altamente degenerativa y sus causas pueden ser malos hábitos de alimentación, poca o escasa actividad física, así como herencia familiar. Durante 2017 en México se ha incrementado el número de muertes por la Diabetes Mellitus, y se estima que aumentará la cifra en los próximos diez años. Los Sistemas de Información Geográfica son sistemas informáticos diseñados para la realización de análisis e interpretaciones en la distribución geográfica de diferentes enfermedades crónicas, estos facilitan la representación de dichos datos tales como ubicación, localización y diagnóstico. En ésta investigación se evaluaron los datos totales de casos con Diabetes Mellitus en el estado de Colima, durante el año 2016, los cuales fueron proporcionados por Secretaria de Salud. En 2016 se diagnosticaron un total de 4,855 casos ubicados principalmente en los municipios de Colima, Manzanillo y Tecomán. Para el estudio se creó un sistema de información geográfica, en donde se realizó una comparación geoestadística de casos detectados con diabetes. Este estudio contribuye principalmente a la distribución de dicha enfermedad con la utilidad para ubicar a la población más susceptible, la prevención y el control en ésta enfermedad, lo cual es prioridad en el Sector Salud.

Palabras clave: Diabetes; Sistemas de Información Geográfica; Epidemiología; Distribución Espacial; Enfermedad Crónica.

INTRODUCCIÓN

Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) son definidos e interpretados como un conjunto de programas y aplicaciones de tipo informático, que facilitan la gestión de datos organizados en bases de datos referenciadas espacialmente [1]. Las aplicaciones de éstos son diversos, ya que permiten un análisis rápido y de bajo costo, además de la generación de mapas para las necesidades específicas en diversas áreas [2].

Durante los últimos años se ha desarrollado diversos estudios relacionados con los SIG que buscan presentar nuevas metodologías y área de estudio, para la aplicación de estas herramientas [3].

Aplicación de los Sistemas de Información Geográfica

Las aplicaciones de los Sistemas de Información Geográfica (SIG) en el sector salud, como la gestión de recursos sanitarios, análisis de enfermedades y estudios epidemiológicos, son una de las aplicaciones más desarrolladas de los sistemas de información geográfica [4].

En la actualidad se cuenta con diversos programas para el geo-procesamiento digital, los cuales tienen como objetivo capturar, almacenar, manipular, administrar y analizar información espacial. Prácticamente cualquier tipo de información puede ser recopilada, teniendo como limitante, un atributo que permita su ubicación. Los campos en los que éste sistema ha sido aplicado puede ser en el ámbito forestal, geológico, biológico, epidemiológico y médico entre otros [5,6,7].

El uso de estos sistemas en el ámbito de salud o epidemiológico, permite localizar y analizar la concentración y/o dispersión de las enfermedades estudiadas. Éste es sólo uno de los aportes proporcionados por el desarrollo de estos sistemas en el ámbito epidemiológico [8]. La versatilidad del SIG incluye el análisis de los factores y variables externas a la enfermedad pero que ejercen una influencia sobre la misma. Como resultado de esta combinación de factores y variables, es posible determinar zonas de concentración así como realizar predicciones que ayuden a detectar comportamientos, incrementos y cambios en una determinada enfermedad [9,10].

Sistemas de Vigilancia de la Salud Pública basados en SIG

Los sistemas de información geográfica son útiles cuando se emplean para el análisis de datos clínicos y cuentan con varios escenarios relacionados con las ciencias sociales [11]. Los análisis y resultados realizados en este ámbito, son utilizados frecuentemente para la vigilancia y seguimiento de enfermedades clínicas infecciosas. A pesar de los avances en la tecnología de los SIG, todavía no se ha logrado tener un equilibrio entre la vigilancia de la salud pública y la confidencialidad o privacidad de los datos. Esto genera deficiencias significativas en el análisis de datos, compatibilidad del sistema, mantenimiento y accesibilidad, en ocasiones la información recabada puede ocasionar problemas por falta de atención en la obtención de datos, con esto se hace referencia a la captura de datos sobre casos, lo que puede generar una investigación poco profunda y no sistematizada.

Uno de los datos básicos para fines de geolocalización, es el lugar de residencia del paciente. El análisis de los datos basados en su localización, se expresa en mapas que representan visualmente los datos de salud georreferenciados de una manera directa, comunicando así fácilmente la información a los usuarios finales [11].

Los sistemas de información geográfica en el campo clínico facilitan la interpretación y utilización de los datos en la investigación, tanto en el ámbito social como en el geográfico.

Actualmente existen un gran número de programas para la recolección y almacenamiento de datos que permiten tener una visualización de la información en muchos sectores de investigación, pero en este caso se utilizaron para el sector salud.

Dentro de los softwares más utilizados con fines geoespaciales se encuentran: Esri, Geomedia, Grass Gis, GvSIG Asociación, Map Info, AutoCAD, Qgis, TransCAD, eSpatial e Idrisi Selva.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en colaboración con la Secretaría de Salud y Bienestar Social del Gobierno del Estado de Colima. Utilizando su base de datos, fue posible ubicar e interpretar la distribución de la diabetes en el estado. Es importante mencionar que los datos geoespaciales fueron obtenidos de la página del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Éstos corresponden a las Áreas Geoestadísticas Municipales de Colima del 2015.

El software utilizado para el desarrollo del proyecto fue el ArcGIS versión 10.0. Dentro de esta aplicación, es posible añadir mapas de terreno. Estos se utilizaron para darle profundidad y relieve a los mapas.

I. Base de Datos. La Secretaria de Salud otorgó un total de 3 bases de datos elaboradas por cada unidad médica de los municipios de Colima, Manzanillo y Tecomán. En estas se indican el total de individuos con diabetes a nivel municipal. Éstas contaban con datos asociados al paciente detectado con Diabetes Mellitus (DM). Entre los datos recabados para el expediente médico del paciente, se encuentran mediciones de colesterol y glucosa, peso, edad, género, IMC (índice de Masa Corporal), etcétera. Para el desarrollo de este proyecto, se tomaron datos como IMC, edad y género del paciente.

II. Asociación de datos tabulares a datos espaciales. En este paso, los datos tabulares proporcionados por la Secretaría de Salud, son asociados a datos geoespaciales previamente descargados de la página del INEGI. Aun cuando existe una diferencia temporal de un año entre los datos de la SSC (2016) y los Geoespaciales del INEGI (2015), esto no representó un problema para la conexión de los datos.

III. Construcción de mapas. Los mapas son una representación visual y espacial de los datos proporcionados por la Secretaría de Salud. El objetivo de este análisis espacial es el de encontrar patrones entre las variables presentadas. Los municipios considerados en esta investigación son Colima, Manzanillo y Tecomán. Las capas que se consideraron para el desarrollo de nuestro SIG fueron: División Municipal, División Estatal.

IV. Comparación geoestadísticas de los casos de Diabetes que existen en cada municipio. Para este paso se tomaron en cuenta las variables de edad, género e Índice de Masa Corporal de los pacientes con Diabetes Mellitus para los municipios mencionados anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colima es un estado de la República Mexicana que cuenta con una extensión territorial de 5.627 km^2 aproximadamente. Colinda al noroeste con el estado Jalisco, al sureste con el estado de Michoacán. A Colima lo conforman 10 municipios que son; Armería, Colima, Cómala, Coquimatlán, Cuauhtémoc, Ixtlahuacán, Manzanillo, Minatitlán, Tecomán y Villa de Álvarez.

En el año 2016 en el estado de Colima se obtuvieron un total de 4,855 casos positivos con Diabetes Mellitus en los municipios de Manzanillo, Colima y Tecomán (Fig. 1).

Manzanillo es un municipio altamente turístico. Colinda al Norte con el municipio de Cuautitlán de García Barragán, al Este con Coquimatlán y Armería, al Sur con el Océano Pacifico y al Oeste con Cihuatlán.

Manzanillo cuenta con una extensión territorial de 1.578 km^2. En este municipio se reportaron un total de 559 casos positivos con Diabetes Mellitus (Fig. 1). En la mayoría de los casos se ha detectado un mayor número de pacientes del género femenino con un total de 342 individuos versus los 217 del género masculino (para verificar proporciones ver tabla 1).

El municipio de Colima cuenta con una extensión territorial de 3.312km^2. Colima es un municipio perteneciente a la capital del estado de Colima, es uno de los municipios más importantes y poblados del estado. Este municipio se posiciona en segundo lugar con un total de 2,098 casos positivos con diabetes de los cuales son 714 casos hombres y 1384 casos mujeres (Fig.1).

Tecomán es un municipio que colinda al Norte con Coquimatlán, al Este con Ixtlahuacán, al Sur con Coahuayana y al Oeste con Armería. Cuenta con una extensión territorial de 834.8 km². En el año 2016 hubo un total de 2,198 casos de Diabetes Mellitus, siendo éste el municipio con mayor presencia de pacientes que el resto (Fig. 1).

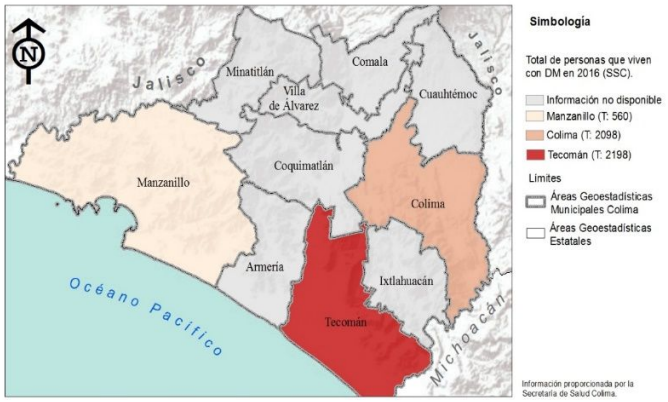


Figura 1: Municipios del Estado de Colima donde se reportaron individuos con Diabetes Mellitus.

En la figura 1, se muestran los 3 municipios de los que se tiene información, marcados en una gama de colores degradados que van del rojo al rosa.

En rojo carmín, resalta el municipio de Tecomán, ya que sólo aquí se localizaron el 45% del total de los pacientes registrados con diabetes mellitus para estos tres municipios en 2016. En rosa se encuentra Colima con un total de 2098 casos (43%) y en tono más claro, Manzanillo, ya que este municipio presentó el 12 % del total de pacientes registrados.

El índice de masa corporal (IMC) es una relación matemática entre peso y altura del individuo. El IMC ha resultado ser un útil indicador para evaluar si la obesidad tiene relación con las enfermedades crónicas degenerativas (Navarrete, 1991).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado los estados nutricionales de acuerdo al Índice de Masa Corporal en Peso Bajo (<18.5), Normal (18,5 - 24,99), Sobrepeso (25,00 - 29,99) y Obesidad (≥30,00) (OMS, 1995).

La distribución de la población se estudió de acuerdo al Índice de Masa Corporal que presentaron en el reporte médico, y además se consideró un análisis por género. La figura 2 muestra el género masculino y la figura 3 el género femenino. En ambas figuras se muestra también en gama de grises, el total de pacientes reportados para cada uno de los municipios de los que la SSA presentó información. En gris oscuro resalta Tecomán (figs. 2c y 3c), como ya se había comentado anteriormente, aquí se concentra el 45% de los casos. La figura "d", para ambos casos, es una agrupación del comportamiento de esta variable para los tres municipios.

Hay casos de bajo peso entre los pacientes (IMC > 18.5), siendo esta una visible minoría tanto para el género masculino como el femenino (figs. 2 y 3).

El segundo rango con menos observaciones pertenece al normal (IMC =18.5 – 24.99), una situación persistente en ambos géneros (Figs. 2 y 3).

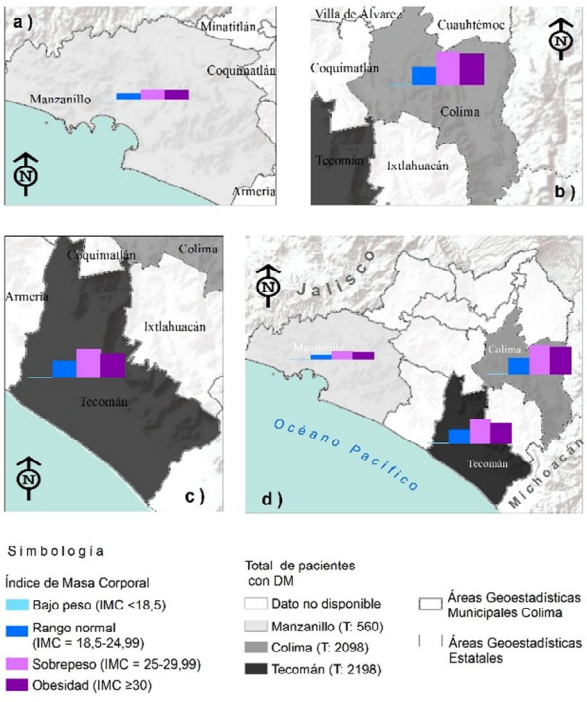


Figura 2: Distribución de la población del género masculino de acuerdo a su IMC.

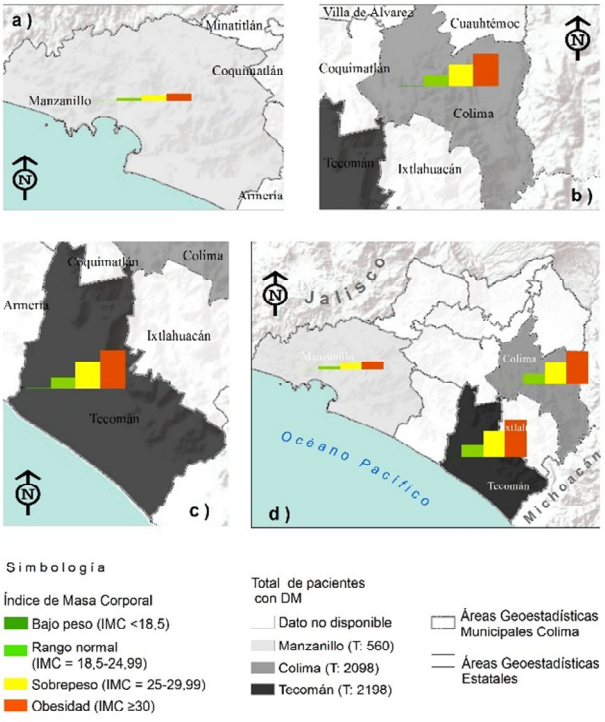


Figura 3: Distribución de la población del género Femenino de acuerdo a su IMC.

Las diferencias de distribución entre géneros aparecen en el rango de "Sobrepeso", respecto al género masculino (Fig.2), es el que tiene una ligera mayoría por sobre los otros 3 rangos. Incluso en Manzanillo (Fig. 2a) cuando pudiera parecer que son el mismo número de casos, hay una diferencia de 5 observaciones más para pacientes con sobrepeso.

En cambio, el comportamiento de esta variable en mujeres tiende a la alza, entre más alto IMC más individuos. En los 3 municipios (Fig. 3) encontramos que la obesidad en mujeres con diabetes pertenece a una mayoría en los 3 municipios observados.

La versión tabular de lo que plasman los mapas puede ser verificado en la tabla 1.

Tabla 1: Porcentaje por IMC según género y municipio de procedencia

IMC	Manzanillo	Tecomán	Colima
Hombres	39%	28%	35%
Bajo Peso	0%	0%	0%
Peso Normal	9%	7%	7%
Sobrepeso	15%	11%	14%
Obesidad	14%	9%	13%
No disponible	1%	0%	0%
Mujeres	61%	72%	65%
Bajo Peso	0%	0%	0%
Peso Normal	10%	11%	11%
Sobrepeso	21%	25%	21%
Obesidad	29%	36%	33%
No disponible	1%	0%	0%

Para la representación de la diabetes por edades, se decidió segmentar a la población por grupos de edad. Los rangos fueron definidos en intervalos regulares a cada 15 años hasta llegar a los 60. El último rango corresponde a todos pacientes con DM mayores de 60 años.

En el caso de las mujeres, la mayoría de las pacientes se encuentran entre los 46-60 años. El fenómeno se repite en los tres municipios, siendo prácticamente nula la presencia de individuos con la enfermedad de los 0 a 15 años (Fig. 4). Pareciera ser que la tendencia de la enfermedad es a aparecer conforme se avanza en edad. La curva de crecimiento se flexiona, para el caso de las mujeres, después de los 60 años. La figura 4 muestra no solo la distribución de pacientes del género femenino por grupos de edad, sino que también enfatiza el municipio que obtuvo mayor casos de diabetes en el estado. Es importante hacer hincapié que el total de pacientes incluye ambos géneros independientemente si la gráfica muestra sólo la distribución de uno u otro.

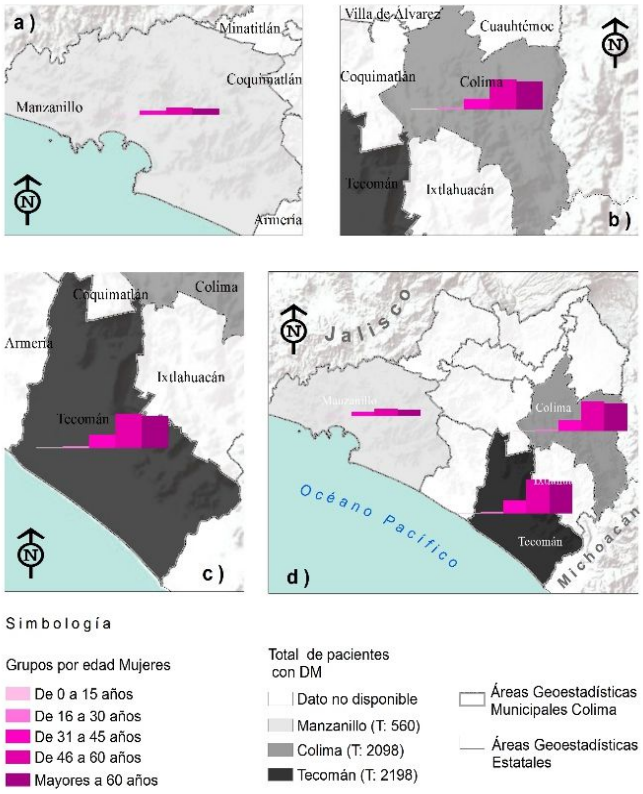


Figura 2: Distribución de pacientes del género femenino con DM por grupos de edad

La tendencia en los varones, contrario a las mujeres, pareciera encontrar una relación edad/aumento de pacientes (Fig. 5), ya que la mayoría de los individuos afectados con la enfermedad pertenecen al rango de edad que va de mayores de 60 años. Todos los municipios muestran una distribución similar de pacientes por grupo de edad. Aún Manzanillo (Fig. 5a) que es el que menos individuos presenta de las 3 entidades municipales.

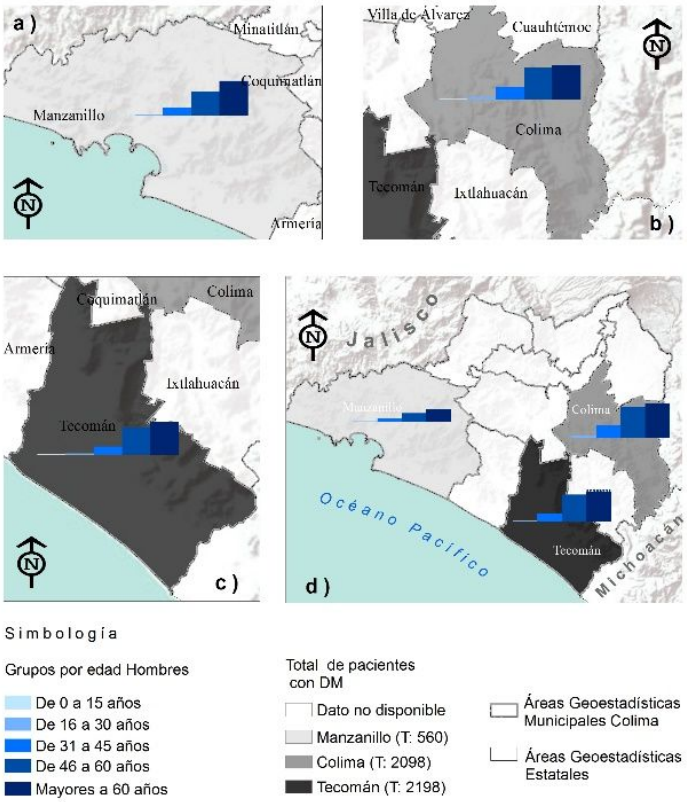


Figura 3: Distribución de pacientes del género masculino con DM por grupos de edad

La tabla 2 muestra la equivalencia tabular de las figuras 4 y 5.

Tabla 2: Porcentaje por rangos de edad según género y municipio de procedencia

Rangos de Edad	Manzanillo	Tecomán	Colima
Hombres	39%	28%	35%
De 0 a 15 años	0%	0%	0%
De 16 a 30 años	0%	0%	1%
De 31 a 45 años	5%	3%	5%
De 46 a 60 años	14%	11%	13%
Mayores a 60 años	20%	13%	15%
Mujeres	61%	72%	65%
De 0 a 15 años	0%	0%	0%
De 16 a 30 años	0%	1%	1%
De 31 a 45 años	14%	12%	10%
De 46 a 60 años	25%	30%	28%
Mayores a 60 años	22%	29%	26%

CONCLUSIONES

El estudio diseñó una nueva estrategia metodológica que incluyó la creación de una serie de mapas que facilitaron la interpretación de los datos proporcionados por la Secretaría de Salud Colima. Se construyó un Sistema de Información Geográfica con base a información proporcionada por la Secretaría de Salud Colima, en donde se observó la distribución de casos de diabetes en 3 municipios del Estado.

En éste documento se intenta describir en una primera instancia el comportamiento y la relación espacial entre las variables representadas así como los resultados que un análisis geo estadístico puede llegar a proporcionar. La temporalidad de los datos usados en este proyecto limitó el análisis de la variable a través del tiempo.

Añadir la variable "tiempo" al estudio hubiera permitido ampliar el análisis del comportamiento de la enfermedad a través del tiempo, pudiendo analizar si hay incremento o decremento de pacientes de un determinado año a otro [12].

En éste estudio se realizó la localización espacial del total de pacientes con Diabetes Mellitus en tres municipios de Colima. Los estudio de distribución espacial no solo se limitan a describir la situación espacial de los elementos observados, sino hacer predicciones que puedan explicar y prever como una enfermedad se comportará en un determinado periodo [11,13].

La prevención y el control de la diabetes, es una prioridad para el Sector Salud y para la población en general. Estudios como éste proyecto pudieran ayudar a una mejor planeación y dirección de los recursos que se destinan a la Salud, así como a la ubicación de la población más susceptible, la prevención y el control en ésta enfermedad, lo cual es prioridad en el Sector Salud.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por CONACYT a través del proyecto PDCPN-2014-247879, Proyectos de Desarrollo Científico para Atención de Problemas Nacionales.

REFERENCIAS

[1] Guagliardo, M. F. Spatial accessibility of primary care: Concepts, methods and challenges.*International Journal of Health Geographics*, 3. 2004.

[2] Rossi, G. A. M., Martins, I. V. F., Campos, R. F. D., Soares, L. F. S., Almeida, H. M. D. S., & Mathias, L. A. Spatial distribution of bovine cysticercosis—A retrospective study in brazil from 2010 through 2015. *Preventive Veterinary Medicine*, 145, 145-149. 2017.

[3] Toran Pour, A., Moridpour, S., Tay, R., & Rajabifard, A. Influence of pedestrian age and gender on spatial and temporal distribution of pedestrian crashes. *Traffic Injury Prevention*, 1-7. 2017.

[4] Hinman, S. E. Comparing spatial distributions of infant mortality over time: Investigating the urban environment of baltimore, maryland in 1880 and 1920. *Applied Geography*, 86, 1-7. 2017.

[5] Shah, T. I., Milosavljevic, S., & Bath, B. Measuring geographical accessibility to rural and remote health care services: Challenges and considerations. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, 21, 87-96. 2017.

[6] Zhang, F., Sun, X., Zhou, Y., Zhao, C., Du, Z., & Liu, R. Ecosystem health assessment in coastal waters by considering spatio-temporal variations with intense anthropogenic disturbance. *Environmental Modelling and Software*, 96, 128-139. 2017.

[7] Zhang, Y., Chu, C., Li, T., Xu, S., Liu, L., & Ju, M. A water quality management strategy for regionally protected water through health risk assessment and spatial distribution of heavy metal pollution in 3 marine reserves. *Science of the Total Environment*, 599-600, 721-731. 2017.

[8] Kauhl, B., Pieper, J., Schweikart, J., Keste, A., & Moskwyn, M. (2017). Spatial distribution of type 2 diabetes mellitus in berlin: Application of a geographically weighted regression analysis to identify location-specific risk groups. *Gesundheitswesen*, doi:10.1055/s-0042-123845

[9] Seixas, R., Nunes, T., Machado, J., Tavares, L., Owen, S. P., Bernardo, F., & Oliveira, M. Demographic characterization and spatial cluster analysis of human salmonella 1,4,[5],12:I:- infections in portugal: A 10year study. *Journal of Infection and Public Health*, doi:10.1016/j.jiph.2017.06.002. 2017.

[10]Adzandeh, A. E., Awope, J., & Oviasu, O. I. A preliminary spatial analysis of diagnosed stroke disease in osun state, nigeria. *Pan African Medical Journal*, 25. 2016.

[11]Robinson, A. I., Carnes, F., & Oreskovic, N. M. Spatial analysis of crime incidence and adolescent physical activity. *Preventive Medicine*, 85, 74-77. 2016.

[12] Holakouie-Naieni, K., Mostafavi, E., Boloorani, A. D., Mohebali, M., & Pakzad, R. Spatial modeling of cutaneous leishmaniasis in iran from 1983 to 2013. *Acta Tropica*, 166, 67-73. 2017.

[13]Ocaña-Riola, R., Montaño-Remacha, C., & Mayoral-Cortés, J. M. Geographical and temporal variations in female breast cancer mortality in the municipalities of andalusia (southern spain). I*nternational Journal of Environmental Research and Public Health,* 13(11). 2016.

INESTABILIDAD GENÓMICA EN RATAS SPRAGUE DAWLEY EXPUESTAS A ALUMINIO ($AlCl_3$).

[1,2]García-Alegría, A.M., [3]Gómez-Álvarez, A., [4]Anduro-Corona, I., [5]Burgos-Hernández, A., [1,2]Ruiz-Bustos, E., [2]Cáñez-Carrasco, M.G., [5]Canett-Romero, R., y [1,2,4*]Astiazarán-García, H.F.

1. Universidad de Sonora, Posgrado en Ciencias de la Salud, Luis Encinas y Rosales s/n. Centro, CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.
2. Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Luis Encinas y Rosales s/n. Centro, CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.
3. Universidad de Sonora. Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Luis Encinas y Rosales s/n. Centro, CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.
4. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Dirección de Nutrición. Carretera a la Victoria Km 0.6, CP 83304, Hermosillo, Sonora, México.
5. Universidad de Sonora. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Luis Encinas y Rosales s/n. Centro, CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

*Autor para correspondencia: hastiazaran@ciad.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

Las formas solubles de aluminio (Al) para uso o consumo humano recientemente han sido consideradas potencialmente tóxicas, debido a que han sido relacionadas con alteraciones en hígado, cerebro, médula ósea, hematológicas y neoplásicas, entre otras. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto genotóxico del aluminio en la inestabilidad genómica relacionada con el desarrollo de cáncer de mama inducido con N-metil-N-nitrosourea (MNU) en ratas Sprague Dawley. Se evaluó el comportamiento dietario de las ratas y posteriormente se determinó la concentración de aluminio en glándula mamaria mediante espectroscopia de absorción atómica. La inestabilidad genómica se determinó en cortes histológicos de glándula mamaria teñidos con HE. También se realizó ensayo de micronúcleos y ensayo cometa en sangre periférica. Los resultados de evaluación dietaria indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos experimentales. La concentración de Al en tejido mamario fue mayor en el tratamiento +2000Al/-MNU. Este tratamiento experimental produce proliferación celular intraductal moderada, hiperplasia de ganglios linfáticos y adenoma de glándulas serosas. Los resultados para el ensayo de micronúcleos y el ensayo cometa indican que +2000Al/-MNU causa efecto genotóxico a partir de los 10 días de exposición y el daño es más evidente a partir de los 15 días de exposición al tratamiento. Se puede concluir que hay inestabilidad genómica y que no se asocia a cáncer de mama en ratas Sprague Dawley.

Palabras clave: Aluminio, genotoxicidad, ratas Sprague Dawley.

INTRODUCCIÓN

Estimaciones recientes hechas en Estados Unidos de Norteamérica, establecen que una persona adulta, joven y de clase media consume alimentos y bebidas que contienen aluminio y señalan que la cantidad ingerida está entre 105 y 150 mg de Al/día, en promedio. Esto significa que las personas están expuestas

constantemente al uso o consumo frecuente de aluminio en sus diferentes formas o presentaciones [1]. A las formas solubles de aluminio se le consideran potencialmente tóxicas debido a su alta solubilidad en agua, su capacidad genotóxica y porque cotidianamente estamos expuestos de manera subaguda y crónica a estas formas solubles de aluminio [2]. Actualmente, el aluminio está siendo investigado por su posible relación con alteraciones neurológicas, hepáticas, óseas, hematológicas y cáncer de mama [3]. Con respecto a la posible asociación entre aluminio inestabilidad genómica y cáncer de mama, hasta el momento los resultados obtenidos son contrastantes debido a que hay investigaciones que afirman y otras niegan esta posible asociación. El principal problema relacionado con estos resultados contrastantes es que no se tiene el control de muchas variables que influyen en los resultados obtenidos y que aun así, han sido publicados. Por esta razón, el objetivo de la presente investigación es evaluar el efecto de la concentración de aluminio en ratas Sprague Dawley, sobre la inestabilidad genómica. Esto permitirá elaborar nuevas estrategias para abordar la exposición por el uso y/o consumo de formas solubles de aluminio, así como los riesgos genotóxicos y su relación con la génesis del cáncer de mama en humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se seleccionaron cuarenta y ocho ratas hembra Sprague Dawley desarrolladas de nuestra colonia en el bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, con un peso entre 180 y 230 g.

Diseño experimental (tratamientos)

Grupos de ocho ratas fueron asignadas completamente al azar a uno de los siguientes tratamientos experimentales: Tratamiento A, ratas sin aluminio y sin inducción de cáncer de mama (Control negativo, -Al/-MNU). Tratamiento B, ratas con aluminio a 500 mg/L (2.5 mg de Al/Kg de peso corporal e inducidas a cáncer de mama con MNU (+500Al/+MNU). Tratamiento C, ratas con aluminio a 1000 mg/L (5.0 mg de Al/Kg de peso corporal e inducidas a cáncer de mama con MNU (+1000Al/+MNU). Tratamiento D, ratas con aluminio a 2000 mg/L (10.0 mg de Al/Kg de peso corporal) e inducidas a cáncer de mama con MNU (+2000Al/+MNU). Tratamiento E, ratas con aluminio a 2000 mg/L (10.0 mg de Al/Kg de peso corporal) y sin inducción de cáncer de mama (+2000Al/-MNU). Tratamiento F, ratas sin aluminio y con inducción de cáncer de mama con MNU (control positivo, -Al/+MNU). Las ratas sin aluminio y sin inductor de cáncer de mama (MNU) fueron tratadas con solución salina fisiológica al 0.98% para igualar las condiciones de manejo experimental. A las ratas se les administró 1 mL de la solución de aluminio ($AlCl_3$) por vía intragástrica (gavage) por cinco días a la semana durante 90 días. En tanto que la vía de administración de MNU fue por vía intraperitoneal, a los 50 y 70 días de edad [4].

Inducción de cáncer de mama en ratas

Las ratas fueron tratadas con dosis de 50 mg/Kg de peso corporal con MNU (N-metil-N-nitrosourea, N1517-1G Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aplicado a los 50 y 70 días de edad, para inducir adenocarcinoma mamario [5].

Condiciones de manejo de bioterio

Ciclos de luz/oscuridad de 12 hr, humedad entre 40 y 70%, temperatura entre 18 y 22 ^{o}C, agua y alimentos *ad libitum* [6].

Dieta

Dieta basal de alimento tipo pellets que contiene 23% de proteína, 1% de vitaminas, 4% de minerales, 4% de fibra, 6.5% de grasa, 0.2% de bitartrato de colina, 0.2% de metionina, otros componentes menores de la dieta y almidón hasta completar el 100%. Humedad máxima 12%. Este alimento es producido por LabDiet, de Estados Unidos de Norteamérica y comercializado por PetFood de México.

Evaluación dietaria

La evaluación dietaria se realizó para determinar si los tratamientos experimentales o el manejo de los animales de experimentación afecta su comportamiento biológico. Esto se consideró prudente determinar ya que no se tenía la certeza de que las soluciones de aluminio ($AlCl_3$) administrado con sonda por vía intragástrica (gavage) o la administración de NMU por vía intraperitoneal, podrían afectar este comportamiento biológico de las ratas Sprague Dawley. Se evaluó el consumo diario de alimento (CDA), ganancia en peso semanal (GPS), conversión alimenticia (CA) y eficiencia alimenticia (EF). El alimento y las ratas se pesan dos veces por semana en balanza granataria y con los valores obtenidos se realizó la evaluación dietaria [7].

Toma de muestras

Muestras de tejido mamario. Mediante cortes quirúrgicos de glándula mamaria de ratas anestesiadas en cámara de cloroformo y eutanizadas por dislocación cervical, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-1999 [8,9], para evitar el sufrimiento animal. A estas muestras se les cuantificó la concentración de aluminio y se utilizaron para evaluación histopatológica.

Muestras sanguíneas. Obtenidas por corte de cola para evaluación de genotoxicidad mediante análisis de micronúcleos (MN) y por punción intracardiaca para evaluación de genotoxicidad mediante análisis de electroforesis alcalina en células individuales (ensayo cometa).

Determinación de la concentración de aluminio en tejido mamario

Las muestras fueron previamente digeridas en horno de microondas TITAN MPS Perkin Elmer. Para ello se pesaron 0.4 ± 0.02 g de tejido mamario y se colocaron en tubos de digestión de teflón de 15 x 2.5 cm que contenían 7 mL de HNO_3 concentrado y las condiciones de digestión fueron 200°C, 35 barr, 1600 watss, durante 47 minutos [10]. El residuo ácido resultante se aforó a 100 mL con agua desionizada para posteriormente cuantificar la concentración de aluminio.

La determinación de la concentración de aluminio en el estándar, material de referencia certificado y tejido mamario de las ratas, se hizo mediante espectroscopia de absorción atómica en el equipo automatizado AAnalyst 400 Perkin Elmer en modalidad horno de grafito, bajo las condiciones de operación recomendadas por el proveedor. Previamente el método analítico había sido optimizado y posteriormente se realizó la validación y la estimación de la incertidumbre expandida del método analítico para cuantificar aluminio por espectroscopia de absorción atómica por flama (EAAF) y por horno de grafito (EAAHG) [11,12,13].

Evaluación de la inestabilidad genómica

Evaluación histopatológica. La inestabilidad morfológica se evaluó mediante preparaciones de cortes histológicos de glándulas mamarias de ratas, montados en laminillas fijas, utilizando un micrótomo y el

teñido de las preparaciones mediante la tinción de hematoxilina y eosina, que fueron observadas al microscopio óptico marca LEICA modelo DME a 40 y 100X [14].

Análisis de micronúcleos. Para la evaluación de micronúcleos (MN) se utilizaron tres ratas Sprague Dawley hembras de 200 ± 20 g de peso corporal, por grupo (Tratamiento). La toma de muestras de sangre periférica se realizó de acuerdo a lo que establece la Normatividad vigente (NOM-033-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-1999), a los 5, 10 y 15 días de los tratamientos experimentales. Para ello se recolectaron 0.5 mL de sangre periférica en tubos Ependorff de 1.5 mL y con la sangre de cada rata, se realizaron tres frotis (extensiones) en portaobjetos limpios. Los frotis fueron teñidos con colorante de Wright y posteriormente se procedió a contar el número de MN en 2000 eritrocitos (1 MN, 2 MN o más de 2 MN) [15] en un microscopio compuesto de la marca LEICA modelo DME (Buffalo, NY, 14240 USA).

Ensayo de Electroforesis alcalina en células individuales (Ensayo cometa). La viabilidad celular se evaluó con el colorante azul de tripan y conteo de células en cámara de Neubauer/hematocitómetro [16]. El ensayo cometa se realizó de acuerdo al método de Singh [17]. Este ensayo se realizó a nivel exploratorio. Para ello se utilizaron tres ratas hembra Sprague Dawley de los tratamientos A (-Al/-NMU) y E (+2000Al/-NMU), las cuales fueron anestesiadas en cámara de halotano para extracción de 3 a 4 mL de sangre mediante punción intracardiaca y posteriormente eutanizadas por dislocación cervical. Un volumen de 30 µL de sangre completa se agregó a 300 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1% a 37°C. De esta mezcla se tomaron 75 µL y fueron colocados sobre un portaobjetos pre-cubierto con una capa de 150 µL de agarosa regular al 1% qué inmediatamente fue cubierta con un cubreobjetos y mantenidas a 4°C durante 10 minutos. Se retiró el cubreobjetos y se agregaron 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1% a 37°C para formar otra capa y hacer un sándwich que fue cubierto con un cubreobjetos y mantenidas a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente las células fueron lisadas en solución de lisis (2.5 mM de NaCl, KOH 1%, 100 mM de EDTA, 10 mM de Trizma base, Tritón X-100 al 1% y DMSO al 10%) durante 1 hora a 4°C. Seguidamente las muestras se colocaron en cámara de electroforesis oscura conteniendo buffer de corrida alcalino frío a pH > 13 (300 mM de NaOH, 1 nM de EDTA, ajustando el pH > 13). Se dejaron reposar las muestras durante 20 minutos en frío. Las condiciones de la corrida electroforética fueron 25 mV, 300 mA durante 20 minutos.

Después de la electroforesis se retiraron las laminillas y fueron lavadas tres veces con buffer de neutralización (0.4 mM de buffer Tris ajustado el pH a 7.5) durante 5 minutos por cada lavado. Finalmente las laminillas fueron lavadas dos veces con alcohol etílico absoluto anhidro durante 5 minutos cada lavado. Se eliminó el exceso de alcohol y se dejaron secar. Se tiñeron las laminillas con 25 µL de bromuro de etidio (20 µg/mL en agua desionizada) y se cubrieron con cubreobjetos. Todas las etapas del ensayo cometa se llevaron a cabo bajo luz indirecta amarilla o en la oscuridad. Las observaciones de los cometas se hicieron con un microscopio de fluorescencia marca LEICA modelo DM2500 equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital enfriada con luz monocromática, marca LEICA modelo DFC450C de 5 megapixeles, con adaptador C-mount. Las evaluaciones de los cometas se realizaron en el software CometScore de Tritek. El daño del ADN se reporta como momento de cola Olive [18].

Análisis estadístico

La prueba de Kolmogorov-Smirnov fue utilizada para verificar la normalidad de los datos de la evaluación dietaria y concentraciones de aluminio en tejidos. Los datos de las variables que si cumplieron con los supuestos de normalidad, fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía por el procedimiento de modelos lineales generales (GLM ANOVA), donde el efecto principal fueron los tratamientos experimentales. El modelo incluyó los efectos fijos de los tratamientos y el tiempo de muestreo (bloques). Cuando existieron diferencias entre las medias, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Las significancias estadísticas fueron consideradas a una probabilidad en el error Tipo I de 0.05 ($P<0.05$). Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS versión 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación dietaria

En la Tabla 1 se puede apreciar que no existió diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre los tratamientos experimentales respecto a ninguno de los parámetros dietarios evaluados, por lo que se puede considerar que ni los tratamientos experimentales ni el manejo de los animales de experimentación afectaron el comportamiento dietario de las ratas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores quiénes trabajaron con dietas y hierro, así como dietas con zinc o cobre en ratas Sprague Dawley, respectivamente [5,19].

Determinación de la concentración de aluminio en tejido mamario

En la Tabla 2 se puede apreciar que existió diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre el tratamiento +2000Al/-NMU con respecto a los demás tratamientos experimentales, con un valor de 38.17 ± 2.49 µg de Al/g de tejido mamario.

Tabla1. Comportamiento biológico (media ± EE) de ratas Sprague Dawley, mediante la evaluación dietaria a través de un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$).

	TRATAMIENTOS*						
Variables	-Al/-NMU	+500 Al/+NMU	+1000 Al/+NMU	+2000 Al/+NMU	+2000 Al/-NMU	-Al/+NMU	Valor de P**
n	8	5	7	8	8	7	
Consumo de alimento (g)	1567.23 ± 64.16	1603.72 ± 81.16	1801.93 ± 68.59	1734.91 ± 64.16	1710.89 ± 64.16	1747.09 ± 68.59	NS
Ganancia total en peso (g)	84.50 ± 7.61	80.68 ± 9.63	75.78 ± 8.14	83.29 ± 7.61	82.80 ± 7.61	76.20 ± 8.14	NS
Conversión alimenticia	20.10 ± 2.26	22.43 ± 2.86	24.42 ± 2.41	22.18 ± 2.26	22.14 ± 2.26	23.46 ± 2.41	NS
Eficiencia alimenticia	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	NS

* = Al/MNU = ± Aluminio/± Metilnitrosourea. ** = Valor de P, NS = no significativo, significativo $P \leq 0.05$. n = número de datos. EE = Error experimental

Tabla 2. Concentración de aluminio en µg/L (medianas) en tejidos de ratas Sprague Dawley cuantificados por EAAHG, evaluados mediante chi cuadrada (X^2) y con la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$).

	TRATAMIENTOS*						
Variables	-Al/-NMU	+500Al/+NMU	+1000Al/+NMU	+2000Al/+NMU	+2000Al/-NMU	-Al/+NMU	Valor de P**

n	8	5	7	8	8	7	
Mama	11.41[a]	7.83[a]	11.72[a]	12.31[a]	38.17[b]	17.92[ab]	0.0001

* = Al/MNU = ± Aluminio/± Metilnitrosourea. ** = Valor de P, NS = no significativo, significativo P ≤ 0.05

Otros investigadores encontraron que la concentración de aluminio es mayor en glándula mamaria de ratas Sprague Dawley, con respecto a otros tejidos, al cuantificar la concentración de varios metales suministrados por la dieta [20].

Evaluación de la inestabilidad genómica

Evaluación histopatológica. Los resultados histopatológicos se muestran en la Figura 1. Se aprecia que el efecto de los tratamientos corresponde a hiperplasia, y no hubo evidencia de desarrollo de cáncer [14]. El MNU es un inductor de cáncer de mama en ratas de laboratorio [21]. Sin embargo, en nuestra investigación, este compuesto solo provocó mínima proliferación celular del epitelio ductal (F). El cambio histopatológico más significativo del tratamiento +2000Al/-NMU (E), es qué provocó proliferación celular del epitelio ductal moderada comparado a los demás tratamientos (B, C, D y F).

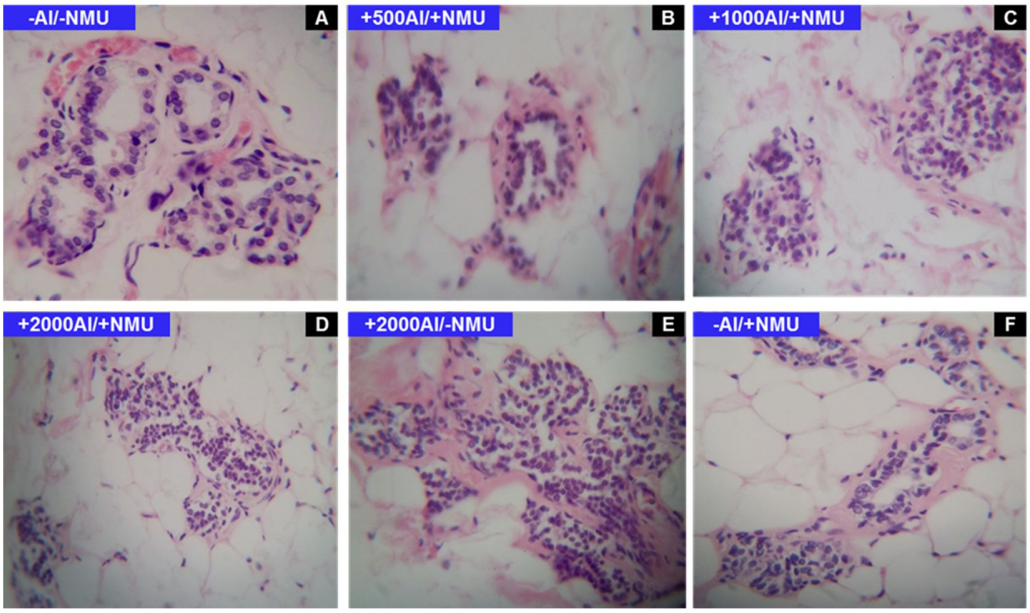


Figura 1. Se muestra el cambio histológico encontrado en el tejido mamario de las ratas Sprague Dawley con los diferentes tratamientos usados. La hiperplasia de los conductos mamarios fue mínima (B y F) a moderada (C, D y E). HEx400.

Análisis de micronúcleos. En el caso de los conteos con 1 MN, se encontró un efecto del tratamiento y el tiempo de exposición (P<0.05), tal como se aprecia en la Figura 2. Los resultados indican que en los tratamientos con Al y NMU (500Al/+NMU, 1000Al/+NMU y 2000Al/+NMU) el efecto aparente es intermedio. Lo anterior significa que no hubo un efecto sinérgico entre aluminio y NMU, tal y como ya se observó en los resultados obtenidos para concentración de aluminio en glándula mamaria y en la evaluación histológica de mama. Los tratamientos en donde se observa una mayor (P<0.05) cantidad de MN son los de +2000Al/-NMU y -Al/+NMU, y aunque la media de los MN sea mayor en el tratamiento

+2000Al/-NMU comparada contra la media del tratamiento -Al/+NMU, no hubo diferencia significativa (P >0.05), y esto se debe a que la varianza entre las réplicas para el tratamiento +2000Al/-NMU es grande. Cabe destacar que el tratamiento que contiene solo aluminio, por sí mismo es capaz de producir genotoxicidad en las ratas. También es importante señalar que los efectos genotóxicos comienzan a manifestarse de manera significativa (P<0.05) a partir del día 10 y muestran valores mayores al día 15 (efecto del tiempo de exposición), lo cual indica un efecto subagudo por bioacumulación de aluminio.

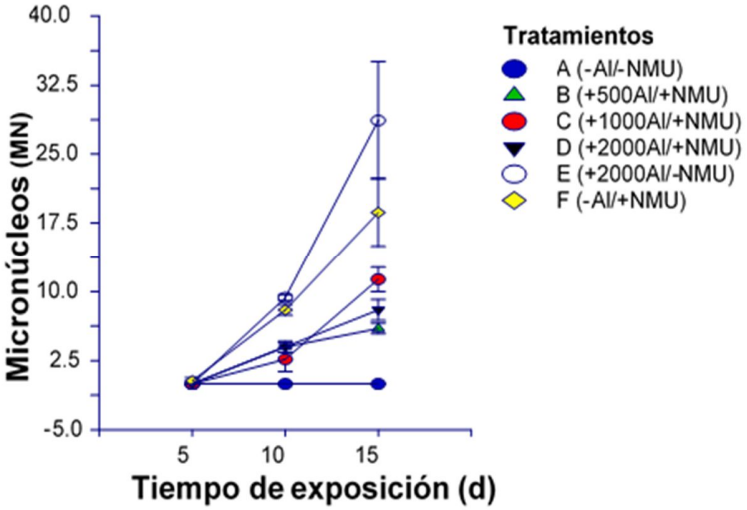


Figura 2. Genotoxicidad (1 micronúcleo) causada por los tratamientos experimentales en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición.

Por otro lado, Türkez *et al.* [22] evaluaron la genotoxicidad hepática provocada por soluciones de $AlCl_3$ en ratas Sprague Dawley y observaron que una dosis subcrónica de $AlCl_3$, administrada por vía intraperitoneal durante 10 semanas, causa incrementos en la cantidad de micronúcleos. Geyikoglu *et al.* [23] encontraron que $AlCl_3$ a dosis de 3 mg de Al/Kg de peso corporal, induce genotoxicidad mediante la formación de MN en hepatocitos de ratas Sprague Dawley, cuando el aluminio es administrado por vía intraperitoneal durante 10 semanas. Por su parte, Al-Obaidy *et al* [24] demostraron que soluciones de $AlCl_3$ a dosis de 10, 15 y 25 mg de Al/Kg de peso corporal de ratas albinas (*Rattus norvegicus*) macho, provoca aumentos en la cantidad de micronúcleos en médula ósea, cuando el aluminio se administra por vía intraperitoneal, y que la cantidad de micronúcleos es mayor al aumentar la dosis. Es necesario aclarar que en algunos trabajos de investigación se ha demostrado que al aumentar la dosis, la cantidad de células con MN disminuye y esta disminución se correlaciona con aumento en la cantidad de células que mueren por apoptosis [25]. En el caso de nuestro trabajo de investigación, las soluciones de $AlCl_3$ se administraron por vía intragástrica (gavage) y el efecto genotóxico es similar al provocado por la administración de soluciones de aluminio por vía intraperitoneal, que se reporta en la literatura.

Ensayo de Electroforesis alcalina en células individuales (Ensayo cometa). La viabilidad celular evaluada con azul de tripan fue del 96 ±2%, resultado similar al obtenido por otros investigadores [16]. Este estudio se realizó a nivel exploratorio para determinar si la genotoxicidad provocada por aluminio (en forma de $AlCl_3$) causa daño o fragmentación al DNA en leucocitos de sangre de ratas. En este sentido

solo se utilizaron tres ratas como control negativo (-Al/-NMU) y tres ratas en las que el tratamiento experimental seleccionado fue +2000Al/-NMU.

Este tratamiento experimental ha demostrado que por sí mismo es capaz de provocar proliferación celular intraductal en glándula mamaria y la mayor cantidad de MN a medida que aumenta el tiempo de exposición. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Figura 3 en dónde se observa que en el tratamiento -Al/-NMU (control negativo) no hay daño genotóxico a los 5, 10 y 15 días de exposición. En cambio en el tratamiento experimental +2000Al/-NMU se puede apreciar que a los cinco días de exposición no hay aparición de cometas y solo se aprecian nucleoides o DNA desenrollado, lo cual es consistente con la nula genotoxicidad que se observa con la formación de micronúcleos a los cinco días de exposición. En cambio a los 10 y 15 días se aprecia claramente la genotoxicidad al encontrar la presencia de cometas. Aunque a los 10 y 15 días de exposición a aluminio no se observan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$), con respecto al número de cometas y el % OTM, si lo hay para el caso de la formación de nubes, en los que se encontró que por cada 100 cometas detectados, hay 3 y 73 nubes a los 10 y 15 días de exposición a aluminio, respectivamente. Esto significa un mayor efecto genotóxico a los 15 días de exposición el cual es irreversible y mayor aún comparado contra el efecto que ocasiona la exposición a H_2O_2 [26].

Estudios previos han determinado que aluminio en forma de lactato de aluminio, administrado por vía intragástrica durante 12 semanas, es capaz de provocar fragmentación del DNA en tejido cerebral de ratas hembra Wistar, cuando el efecto genotóxico es evaluado con electroforesis en gel de agarosa [27].

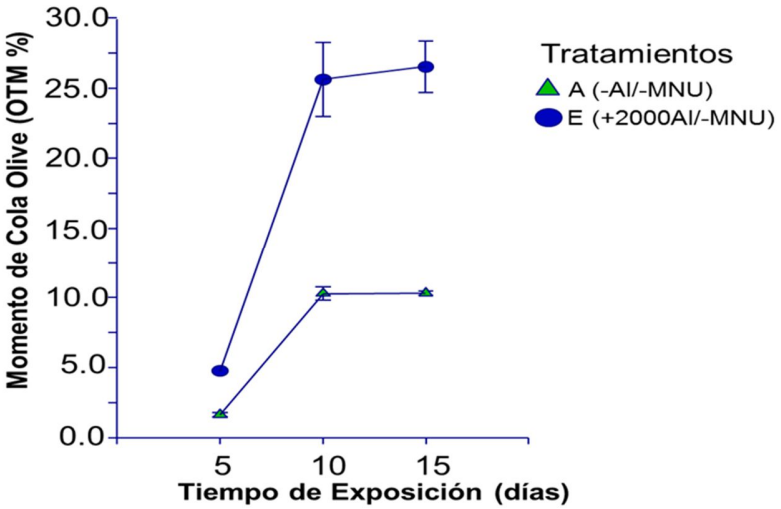


Figura 3. Efecto genotóxico provocado por el tratamiento +2000Al/-MNU en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición, evaluado mediante ensayo cometa, comparado contra el control negativo (-Al/-MNU).

En otros trabajos de investigación también se han encontrado correlaciones entre el daño genotóxico que provoca el aluminio sobre el DNA de linfocitos humanos, evaluado mediante ensayo cometa y ensayo de micronúcleos, al aumentar la dosis y el tiempo de exposición [28]. La ventaja de utilizar el ensayo cometa alcalino, sobre otros métodos *in vitro*, es que este ensayo es capaz de detectar lesiones o

daños al DNA de cadena sencilla o cadena doble, así como roturas en puntos lábiles del DNA de células individuales [29].

CONCLUSIONES

Los tratamientos experimentales no afectaron el comportamiento dietario de las ratas Sprague Dawley, ya que no se observaron diferencias significativas entre grupos para cada uno de los parámetros evaluados (consumo de alimento, ganancia en peso, conversión alimenticia, eficiencia alimenticia). El efecto histopatológico de los tratamientos en los conductos mamarios, es de tipo hiperplásico (proliferativo) de mínimo a moderado y las ratas con el tratamiento +2000Al/-NMU, cuya concentración tisular fue mayor en comparación con el resto de los tratamientos, fue capaz de inducir proliferación celular intraductal moderada. Se demostró que el aluminio provoca inestabilidad genómica y es el tratamiento experimental +2000Al/-NMU el que produce mayor número de micronúcleos y mayor número de cometas y nubes en sangre periférica de ratas Sprague Dawley, al aumentar el tiempo de exposición (5, 10 y 15 días).

REFERENCIAS

[1] Department of Health and Human Services. Division of Toxicology and Environmental Medicine. USA. 2008.

[2] L.A.F. Gil, C.E.P. da Cunha, M.S.G. Gustavo, M.F.M. Salvarani, A. Ronnie, A.F.C. Lobato, M. Mendonça, O. A. Dellagostin, F. R. Conceição, "Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against *Clostridium botulinum* neurotoxin types C and D", *PLOS ONE*, vol. 8, no. 7, pp. 1-10, 2013.

[3] Y. Zhu, Y. Han, H. Zhao, J. Li, Ch. Hu, Y. Li, Z. Zhang, "Suppressive effect of accumulated aluminum trichloride on the hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in rats". *Food and Chemical Toxicology*, vol. 51, pp. 210-214, 2013.

[4] M. Hirata-Koizumi, S. Fujii, A. Ono, A. Hirose, T. Toshio Imai, K. Ogawa, M. Ema, A. Nishikawa, "Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats", *Reproductive Toxicology,* vol. 31, pp. 219-230, 2011.

[5] B. Bobrowska, D. Skrajnowska, A. Tokarz, "Effect of Cu supplementation on genomic instability in chemically-induced mammary carcinogenesis in the rat", *J Biomed Sci*, vol. 18, no. 95, pp. 1-5, 2011.

[6] Y.C. Chou, R.C. Guzman, S.M. Swanson, J. Yang, H.M. Lui, V. Wu, S. Nandi, "Induction of mammary carcinomas by *N*-methyl-*N*-nitrosourea in ovariectomized rats treated with epidermal growth factor", *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 4, pp. 677-684, 1999.

[7] Y. Wang, M. Cheng, B. Zhang, F. Nie, H. Jiang, "Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats" *PLOS ONE*, vol. 8, no. 3, pp. 1-8, 2013.

[8] Norma Oficial Mexicana, NOM-033-ZOO-1995, "Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres", 1995.

[9] Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999, "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio", 1999.

[10] D. Bohrer, M.B. Dessuy, R. Kaizer, P.C. do Nascimento, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, L.M. Carvalho, S.C. Garcia, "Tissue digestion for aluminum determination in experimental animal studies" *Analytical Biochemistry*, vol. 377, pp. 120-127, 2008.

[11] A.M. García-Alegría, A. Gómez-Álvarez, I. Anduro-Corona, A. Burgos-Hernández, E. Ruiz-Bustos, R. Canett-Romero, H.F. Astiazarán-García, "Optimización de las condiciones analíticas ideales para cuantificar aluminio en tejidos de ratas Sprague Dawley, mediante la técnica de absorción atómica", *Revista Internacional de Contaminación Ambiental,* vol. 34, no. 1, pp. 17-24, 2017.

[12] A.M. García-Alegría, A. Gómez-Álvarez, I. Anduro-Corona, A. Burgos-Hernández, E. Ruiz-Bustos, R. Canett-Romero, K.K. Soto-Encinas, H.F. Astiazarán-García, "Validation of analytical method to quantify aluminum in tissues of Sprague Dawley rats by FAAS and GFAAS". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental,* En revisión, 2017.

[13] A.M. García-Alegría, A. Gómez-Álvarez, I. Anduro-Corona, A. Burgos-Hernández, E. Ruiz-Bustos, R. Canett-Romero, M.G. Cáñez-Carrasco, H.F. Astiazarán-García, "Estimation of the expanded uncertainty of an analytical method to quantify aluminum in tissue of Sprague Dawley rats by FAAS and ETAAS", *MAPAN-Journal of Metrology Society of India*, vol. 32, no. 1, pp. 1-11, 2017.

[14] G. Esendagli, H. Canpinar, G. Yilmaz, A. Gunel-Ozcan, M. Oguz-Guc, E. Kansu, D. Guc, "Primary tumor cells obtained from MNU-induced mammary carcinomas show immune heterogeneity which can be modulated by low-efficiency transfection of CD40L gene" *Cancer Biology & Therapy*, vol. 8, no. 2, pp. 136-142, 2009.

[15] A. Balasubramanyam, N. Sailaja, M. Mahboob, M.F. Rahman, S.M. Hussain, P. Grover, "In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test", *Mutagenesis*, vol. 24, no. 3, pp. 245-251, 2009.

[16] S. Pereira, I. Cavalie, V. Camilleri, R. Gilbin, C. Adam-Guillermin, "Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells", *Mutation Research*, vol. 750, pp. 19-26, 2013.

[17] N.P. Singh, R.R. Tice, R.E. Stephensen, E. Schneider, "A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides", *Mutat. Res*, vol. 252, pp. 289-296, 1991.

[18] P.L. Olive, J.P. Banáth, R.E. Durand, "Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay", *Radiat Res*, vol. 122, no. 1, pp. 86-94, 1990.

[19] B. Bobrowska-Korczak, D. Skrajnowska, A. Tokarz, "The effect of dietary zinc - and polyphenols intake on DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats", *Science*, vol. 19, no. 43, pp.1-9, 2012.

[20] K. Oogoshi, S. Yanagi, T. Moriyama, H. Arachi, "Accumulation of aluminum in cancers of the liver, stomach, duodenum and mammary glands of rats", *J. Trace Elm. Electrolytes Health Dis*, vol. 8, no. 1, pp. 27-31, 1994.

[21] A.I. Faustino-Rocha, A. Silva, J. Gabriel, C.I. Teixeira-Guedes, C. Lopes, R. Gil da Costa, A. Gama, R. Ferreira, P.A. Oliveira, M. Ginja, "Ultrasonographic, thermographic and histologic evaluation of MNU-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 67, pp. 771-776, 2013.

[22] H. Türkez, F. Geyikoglu, A. Tatar, "Borax counteracts genotoxicity of aluminum in rat liver", *Toxicology and Industrial Health,* vol. 29, no. 9, pp. 775-779, 2012.

[23] F. Geyikoglu, H. Türkez, T.O. Bakir, M. Cicek, "The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication", *Toxicology and Industrial Health*, vol. 29, no. 9, pp. 780-791, 2012.

[24] O.R.K. AL-Obaidy, A.S.M. Al-Samarrai, Y.S.Y. Al-Samarrai, "Genotoxicity of aluminum chloride (AlCl3) on the albino rat *Rattus norvegicus*", *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*, vol. 9, no. 1, pp. 18-24, 2016.

[25] A. Banasik, A. Lankoff, A. Piskulak, K. Adamowska, H. Lisowsk, A. Wojcik, "Aluminium-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle", *Environ. Toxicol*, vol. 20, pp. 402-406, 2005.

[26] D. Stanić, B. Plećaš-Solarović, J. Petrović, N. Bogavac-Stanojević, M. Sopić, J. Kotur-Stevuljević, S. Ignjatović, V. Pešić, "Hydrogen peroxide-induced oxidative damage in peripheral blood lymphocytes from rats chronically treated with corticosterone: The protective effect of oxytocin treatment", *Chemico Biological Interactions*, vol. 256, pp. 34-141, 2016.

[27] V. Kumar, A. Bal, K. Dip Gill, "Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain", *Toxicology*, vol. 264, pp. 137-144, 2009.

[28] A. Lankoff, A. Banasik, A. Duma, E. Ochniak, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Góźdź, A. Wojcik, "A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes", *Toxicology Letter*, vol. 161, pp. 27-36, 2006.

[29] A. Hartmann, M. Schumacherm, U. Plappert-Helbigm, P. Lowe, W. Suter, L. Mueller, "Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations", *Mutagenesis*, vol. 19, pp. 51-59, 2004.

AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL PROVENIENTES DE POBLACIÓN MEXICANA: PERSPECTIVAS EN EL DESARROLLO DE TERAPIA CELULAR.

[1]Villa-García-Torres, L.S., [1]González-Pelayo, G.L., [2]Escobar-Santibáñez, L.P., [1]Gaona-Bernal J., y [1]Marino-Marmolejo, E.N., [1*]Flores-Hernández, F.Y.

1. Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800 Col Jardines Alcalde C.P.44270, 33455200 Ext. 1328
2. Cirugía Maxilofacial del Hospital Civil "Juan I. Menchaca".

*Autor para correspondencia: fflores@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

Las células troncales de pulpa dental se clasifican dentro de las células madre mesenquimales adultas con capacidad multipotente, son un blanco de investigación en desarrollo de terapia celular y medicina regenerativa. Su obtención no invasiva las promueve como candidatas para la investigación en futuras terapias. Los procesos de aislamiento, cultivo así como la caracterización requieren un análisis que ofrezca información sobre las poblaciones celulares con las que se trabaja, es decir, que éstas cuenten con características específicas de células troncales, para ello la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso desde el 2006 que éstas deberían expresar los marcadores CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B, esto es importante para consolidar la identidad de células troncales mesenquimales, este análisis se puede realizar por medio del uso de anticuerpos dirigidos a estos marcadores, la técnica mayormente utilizada es la citometría de flujo. En este trabajo se establecieron métodos de obtención del tejido pulpar, aislamiento, cultivo y caracterización de células troncales provenientes de pulpa dental, así como algunas perspectivas de aplicación. Estos métodos se llevaron a cabo en muestras de órganos dentarios procedentes de población nacional del estado de Jalisco.

Palabras clave: Células troncales; pulpa dental; regeneración.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales de pulpa dental (DPSC, por sus siglas en inglés) se encuentran dentro de la cámara dental en un tejido suave que contiene células del tejido conectivo, células mesenquimales indiferenciadas, fibras neurales, vasos sanguíneos y linfáticos; la pulpa dental se encuentra rodeada de dentina mineralizada. Las funciones principales de la pulpa dental son la producción y el mantenimiento de la vitalidad de la dentina. Se clasifican dentro de las células madre o troncales ecto-mesenquimales y se derivan de la cresta neural[1].

Las DPSCs tienen un alto potencial proliferativo, una extensa auto-renovación y un gran potencial para diferenciarse hacia linajes celulares como osteogénicos, condrogénicos, adipogénicos y neurogénicos. Pueden obtenerse de las piezas dentales permanentes, dientes primarios, caducifolios, exfoliados y

apicales, así como de dientes supernumerarios, de forma no invasiva, aprovechando el órgano dentario, que es una pieza de desecho[2]. Además su aislamiento se favorece por su gran capacidad de adherencia al plástico cuando son cultivadas, de manera que es posible descartar diversas poblaciones celulares [1], [3].

Para verificar la identidad de las células aisladas, se realizan usualmente técnicas de selección clonal, como la citometría de flujo, detectando poblaciones celulares en función de los marcadores de superficie acoplados a fluorocromos. De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés) las células troncales mesenquimales deben cumplir con características específicas que garanticen la identidad de las poblaciones obtenidas de cultivos primarios, se busca la presencia de marcadores como CD44, CD90, CD73 y CD105, el conjunto de estos marcadores es una característica de células indiferenciadas, se espera que la población de células troncales mesenquimales expresen estos marcadores al menos en un 95%, sin embargo es necesario que las poblaciones sean negativas para CD45, CD34, CD14, C11b, CD79 y CD19, los cuales son marcadores de superficie característicos de células de tipo hematopoyético [1], [4], [5].

Las terapias con células troncales se han convertido en métodos de tratamiento de múltiples enfermedades, diversas investigaciones se han enfocado hacia la promoción de terapia celular aplicada a padecimientos crónicos, entre los cuales se encuentran defectos bucales y maxilofaciales, diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas, entre tras[6].

En los últimos años, los estudios se han centrado en aplicación de células madre e ingeniería tisular para reparar y regenerar las estructuras corporales. Se ha planteado la hipótesis de que las células madre podrían desempeñar un papel clave porque pueden ser fácilmente cultivadas e inducidas a procesos de diferenciación para formar diferentes tipos de células, y con esto llevar a cabo el objetivo de la ingeniería tisular; es decir; restaurar la vitalidad y la función de tejido enfermo y traumatizado [2].

Las células madre de pulpa dental humana se han obtenido por métodos basados en diversos experimentos e investigaciones, entre ellos encontramos el reportado por Raoof y colaboradores en el año 2014, el aislamiento y cultivo de las DPSCs se realizó mediante disgregación enzimática del tejido, ellos reportaron que estos cultivos crecieron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 20% de suero bovino fetal (FBS) a 37°C con 5% de CO_2 y 90% de humedad [7], [8].

Por otra parte, Lin y colaboradores en el mismo año reportaron otro método de aislamiento en el que las células madre de la pulpa dental humana fueron extraídas de piezas dentales, se congelan y después se almacenan a -196°C en tanque de nitrógeno líquido durante 24 horas. Durante la congelación, las células se suspendieron en medio de cultivo que contenía 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), los resultados reportados sobre esta metodología fueron que cuando el medio de congelación no contenía DMSO las tasas de supervivencia de DPSCs aumentaba una vez que se descongelaban y se cultivaban nuevamente. Dos años atrás, Gioventù y colaboradores reportaron una metodología en la que estudiaron cuatro dientes humanos, que criopreservaron haciendo micro canales en el órgano dentario con la ayuda de rayo láser para ser almacenados a -80°C. Este método ahorra tiempo en el aislamiento de células madre de pulpa dental antes de la criopreservación y por lo tanto reduce los costos iniciales y la carga de trabajo del procesado de las piezas dentales [7],[10].

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de órganos dentarios

Las piezas dentales fueron obtenidas por donación bajo consentimiento informado de los pacientes del área de cirugía maxilofacial del OPD (Organismo público descentralizado), Dr. Juan I. Menchaca, en donde se realizó la extracción de las piezas dentales por cirujanos del mismo departamento, al ser obtenidas fueron colocadas en tubos cónicos de 15mL los cuales contenían 3mL de medio RPMI-1640 adicionado con 5% de DMSO, 10% de albumina humana 10%SFB, 100U/ml penicilina, 100mg/mL estreptomicina y 0.25mg/ml de anfotericina B. Las piezas fueron transportadas en cadena fría en hileras de unicel con geles refrigerantes y en caso de ser necesario se congelaron a -80°C, en lo posible se procesaron en las primeras 12 horas después de la extracción.

Obtención de las células de pulpa dental

Para la estandarización de los procesos de obtención de células troncales se utilizaron 30 muestras. En campana de flujo laminar, se procedió a descontaminar las piezas, primeramente, se limpiaron con una gasa con anfotericina-B 0.25mg/mL posteriormente se colocaron en Iodopovidona 8%, PBS1x con 100U/100Mg/mL de Penicilina/Estreptomicina y finalmente en Clorhexidina al 0.12%.

Para la obtención de las células del interior del órgano dentario, se probaron dos metodologías:

1. Perforar los órganos dentarios desde la corona hasta llegar a la cámara pulpar utilizando una pieza de mano de uso odontológico de alta velocidad, para hacer la apertura se perforó la corona del diente con una fresa número 8 de carburo, posteriormente se utiliza una fresa del número 2 de carburo para hacer comunicación con la cámara pulpar y por último se utiliza una endo-Z para ampliar la cavidad con la finalidad de tener un mejor acceso a la cámara pulpar en caso de que se observen ápices inmaduros estos simplemente se retiran con pinzas estériles.

2. Cortar el órgano dentario a tercio cervical dividiendo corona y raíz, utilizando una pieza de mano de baja velocidad y un disco de diamante de doble vista con mandril, irrigando con agua y jeringa la pieza para evitar el sobrecalentamiento de la misma. Al llegar a la cámara se retira el tejido pulpar mecánicamente con la ayuda de pinzas, cucharillas para dentina y limas hendstrom y flexo file, si se observaban restos de tejido se realizaban lavados con DPBS o con el medio de cultivo celular para obtener la mayor cantidad de tejido. Para separar tanto el tejido de los ápices inmaduros como la pulpa dental este se fraccionó con bisturí y se colocó en digestión agregando 1mL de tripsina al 0.005%, la cual estaba diluida en DPBS, la solución se colocó en agitación a 160 rpm a temperatura regulada a 37°C por 20 minutos, vortex 1 minuto, 20 minutos en agitación 220rpm y un minuto en vortex nuevamente, esta suspensión fue centrifugada a 1500rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 5mL de medio αMEM adicionado con 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 10UM L-ácido ascórbico 2-fosfato, 1% penicilina-estreptomicina 100U/100mg/mL y 0.25mg/mL de anfotericina B. Esta suspensión se colocó en botellas de cultivo de 25cm^2 ventiladas y se observaron al microscopio invertido a las 24 horas posteriores y diariamente para verificar que se encontrara libre de contaminación, así como monitorear si ya se observaban células adheridas, el medio fue reemplazado cada tercer día, aproximadamente entre los 7 y 15 días se comenzaron a ver las primeras células en crecimiento en cúmulos o rosetas con morfología fibroblástica típica.

Para el mantenimiento de los cultivos celulares se utilizó medio DMEM suplementado con 10% SBF y 200mM de L-glutamina. Cuando las células se expandieron se criopreservaron.

Caracterización del fenotipo de las células de pulpa dental obtenidas
Se realizó un análisis por citometría de flujo para identificar los siguientes marcadores de membrana: CD73, CD90, CD105 y adicionalmente CD44 (Becton Dickinson Human MSC analysis) así como la ausencia de marcadores de tipo hematopoyéticos.

Las células se retiraron de la botella de cultivo con tripsina 0.005%, se contaron en cámara de neubauer y se colocaron 500,000 células en 300µL de PBS/BSA 0.1%, se prepararon 9 micro tubos con las mismas proporciones. Las células se fijaron con paraformaldehído frío al 4% durante 20 minutos; se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se prosiguió con el marcaje con los anticuerpos. Se colocaron 5 µL de los anticuerpos individuales a cada tubo correspondiente y se colocaron 10µL para los controles de isotipo, así como para el cocktail positivo y negativo, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, protegidos de la luz y en agitación constante a 90 rpm. Se realizó un lavado para retirar el exceso de anticuerpo, se agregó 500µL de PBS/BSA 0.1% y se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 300µL de PBS/BSA 0.1%, se procedió a analizar en el citómetro Accuri C6 BD.

Potencial de diferenciación multi-linaje de las células de la pulpa dental
Se realizó el cultivo de las células de pulpa dental en placas de seis pozos, se colocaron un millón de células por cada uno. La diferenciación hacia osteoblastos (411D-250 Cell aplications), adipocitos (811D-250Cell aplications) y condrocitos (411D-250 Cell aplications), se realizó con medios formulados para dichos procesos, las células se cultivaron con los respectivos medios de diferenciación durante 24 días. Para la confirmación de los tipos de células obtenidas después del proceso, se trabajó con tinciones como lo marca la sociedad internacional de terapia celular para el aislamiento e identificación de células troncales. Se realizó tinción con rojo oleoso para identificar vacuolas lipídicas en las células diferenciadas hacia linaje adipocítico, tinción con azul alciano para identificación de fibras de colágena en las células diferenciadas hacia linaje condrogénico, finalmente, se realizó la tinción de Von Kossá para evidenciar depósitos de calcio en células diferenciadas hacia linaje osteogénico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Crecimiento celular de los cultivos primarios de la pulpa dental
Las células aisladas de la pulpa dental de las piezas colectadas muestran una morfología fibroblastoide alargada, además son adherentes al plástico, la morfología de las células aisladas se aprecia similar a la morfología descrita para células troncales mesenquimales.

En la figura 1 se muestran fotografías representativas del crecimiento de las células obtenidas en cultivo. Las primeras células en crecimiento se observaron entre los 7 y 15 días después del cultivo de los explantes de la pulpa dental.

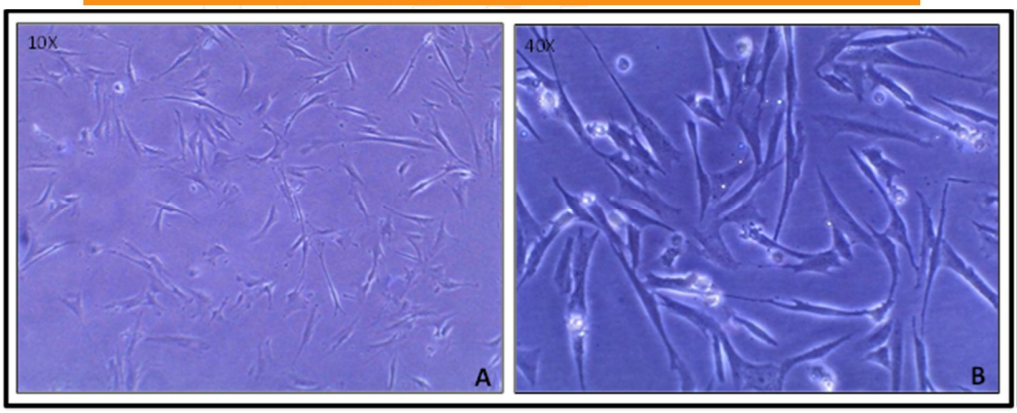


Figura 1. Fotografías representativas del cultivo primario de células de pulpa dental. A) Células en crecimiento con ampliación 10X. B) Células en cultivo primario con ampliación de 40X.

Las colonias celulares en cultivo presentan una morfología fibroblastoide típica de las DPSCs, y son evidentemente adherentes al plástico en cultivo. Éstas se empezaron a cultivar una vez estandarizado el método con las primeras 91 piezas pertenecientes a 30 pacientes, por tal a partir de la muestra 31 se empezaron a tener cultivos en forma estandarizada, se decidió llevar a cabo la metodología 2, es decir, cortar el órgano dentario separando la corona de la raíz ya que se observó que al acceder a la cámara pulpar se generaba una menor cantidad de residuos de hueso y dentina que al perforar la pieza, otra ventaja por la que se decidió la segunda metodología fue debido a que se tenía un mejor acceso al tejido pulpar ya que se logró un diámetro de abertura de las piezas mayor. Posteriormente se conformó una reserva de células que se describe a continuación, corresponde al cultivo de 30 pacientes, esto fue equivalente a 59 cultivos, en donde las edades de 16, 18, 19, 23 y 25 años son las que presentaron mayor porcentaje de crecimiento (Figura 2).

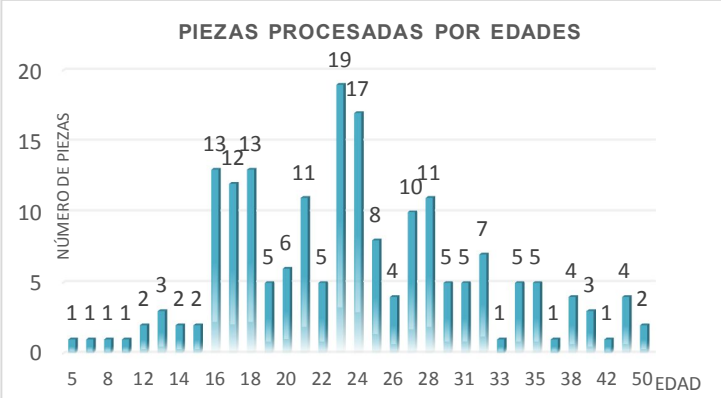


Figura 2. Número de piezas procesadas de acuerdo a las edades de los individuos donantes. La taza de proliferación celular más alta corresponde a individuos de entre 16 a 25 años de edad.

Expresión de receptores específicos de células troncales

Se observó que las células de pulpa dental expresan los marcadores CD73, CD90, CD44 y CD105 en proporciones adecuadas de acuerdo a la ISCT, esto es, en un porcentaje de la población mayor al 95%, por otra parte, no se observaron marcadores de tipo hematopoyéticos (CD34, CD45, CD56, CD14 y HLA), los cuales no deben presentarse en más del 2% de la población celular; en la tabla 1 se resumen los porcentajes de expresión de los marcadores de membrana característicos de células troncales mesenquimales encontrados, se muestran los resultados de tres muestras representativas de los cultivos primarios de células aisladas de pulpa dental (n=30).

Tabla 1. Expresión de marcadores de membrana en las células aisladas de la pulpa dental.

Muestra	Expresión de marcadores de membrana (% de expresión)				
	CD44	CD73	CD90	CD105	Marcadores hematopoyéticos
1	98	98.4	92.7	99.4	0.6
2	99.2	96.0	80.9	96.4	0.4
3	99.7	93.6	94.4	97.1	0.1

En la figura 3 se muestran los resultados del análisis por citometría de flujo donde, se muestran las dobles tinciones para los marcadores CD44 *vs* CD90 y CD73 *vs* CD105.

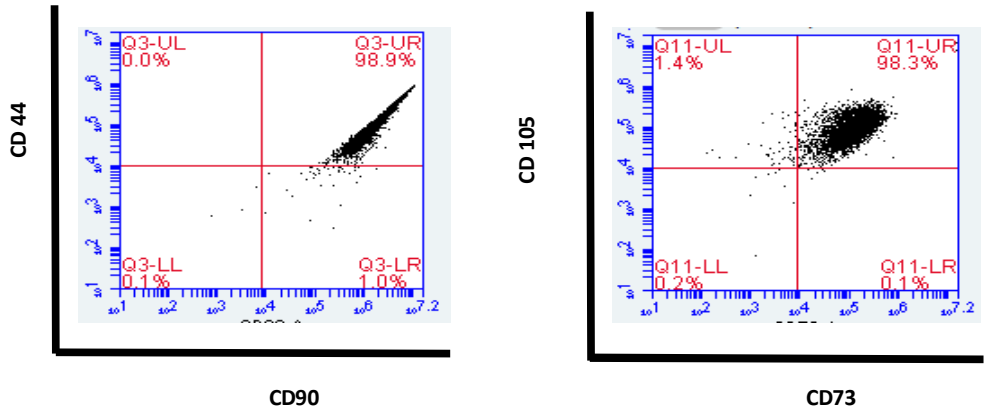


Figura 3. Expresión de receptores específicos de células troncales mesenquimales (muestra representativa). La población celular que se agrupa en los cuadrantes superior derecho de cada gráfico muestra la población positiva para los marcadores analizados, puesto que se muestran las dobles tinciones.

Los diagramas de puntos muestran los porcentajes de la población que expresan marcadores específicos de células troncales, las células positivas se ubican en el cuadrante superior derecho, tal como se observa en estas muestras representativas. El análisis para marcadores de tipo hematopoyético se

muestra en la figura 4, ya que la población celular de estas muestras no expresan este tipo de marcadores, la población celular se concentra en el cuadrante superior izquierdo.

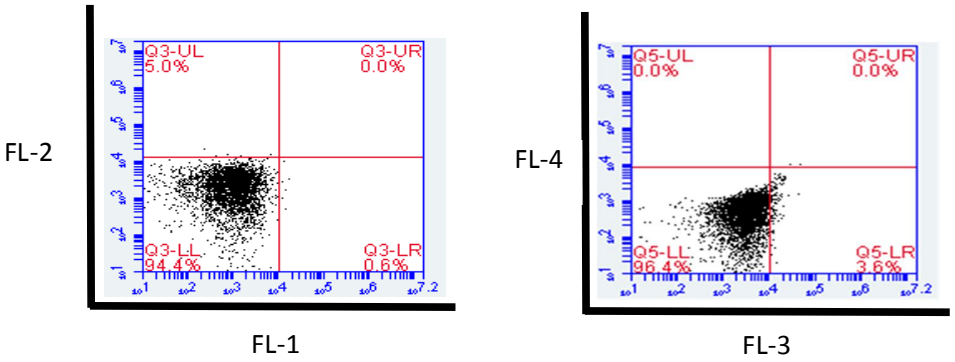


Figura 4. Expresión de marcadores de tipo hematopoyético. Se muestra el análisis de la población celular en gráficos de puntos, donde se observan los cuatro canales de fluorescencia en que se trabajó respecto a la longitud de excitación de los fluorocromos acoplados al conjunto de marcadores hematopoyéticos. Las células aisladas no expresan marcadores de tipo hematopoyético, lo cual es una característica propia de las DPSC, este grupo de marcadores corresponden a CD34 (marcador de célula endotelial), CD45 (leucocitario), CD14 y CD11 (marcadores de macrófagos y monocitos), CD79 y CD19 (marcadores de células B) y HLA- DL.

Potencial de diferenciación multi-linaje

Las células aisladas de pulpa dental se sometieron a procesos de diferenciación hacia tres estirpes celulares originarias cada una de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) para corroborar su multipotencialidad, por lo que deben contar con la capacidad de diferenciarse hacia células de distintos linajes.

Se realizaron tinciones como lo marca la sociedad internacional de terapia celular para el aislamiento e identificación de células troncales.

La tinción con azul alciano evidencia fibras de colágena en la matriz extracelular, lo cual es muestra de la formación de condroblastos, por otra parte, la tinción con rojo oleoso evidencia lípidos intracelulares aglomerados en vacuolas en el espacio citoplasmático, lo cual es característico de los adipocitos, finalmente la tinción de Von Kossá evidencia depósitos de calcio intracelulares aglomerados en el espacio citoplasmático, lo cual es una característica específica de los osteoblastos. En la figura 5 se muestran fotografías representativas de dichos procesos.

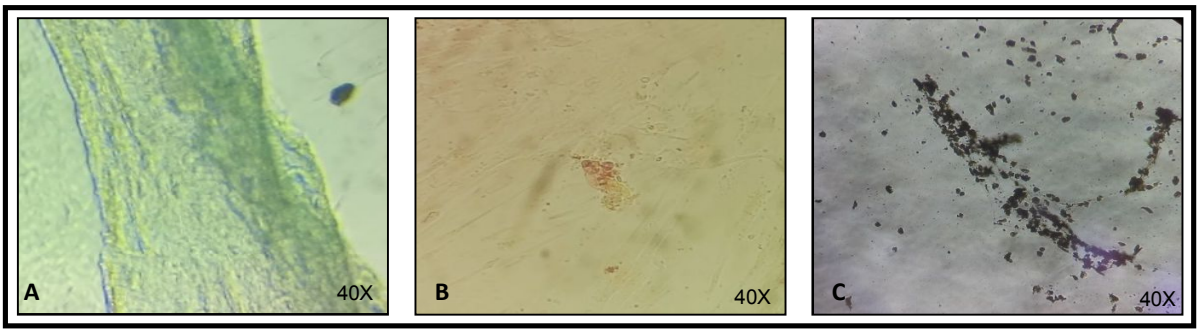


Figura 5. Tinciones de los distintos linajes celulares obtenidos a partir de DPSCs. A) Células condroblásticas teñidas con azul alciano, B) Células adipocíticas teñidas con rojo oleoso, C) células osteoblásticas con tinción de Von Kossá.

Se observa en la imagen A, condroblastos obtenidos, las fibras de colágena características de este linaje se tiñen de color azul celeste tal como se observa en la fotografía, en la imagen B, se observa un conjunto de adipocitos obtenidos también a partir de DPSC, se muestran en color rojo vacuolas lipídicas en el espacio citoplasmático, son características de este linaje, se observa en la imagen C, los osteoblastos obtenidos, la tinción de Von Kossá muestra en color negro a los depósitos de calcio que se encuentran en este tipo de células.
La capacidad de las células aisladas para formar estos tres linajes celulares muestra que tienen el potencial para formar células distintas provenientes de las diferentes capas germinales en el desarrollo.

CONCLUSIONES

El estudio de las DPSC abre camino en la investigación en áreas como bioingeniería de tejidos y terapia celular en enfermedades crónico degenerativas, el crecimiento en estas áreas médico-biotecnológicas podría poner al alcance de los pacientes una cura efectiva y avances significativos en la calidad de vida. Es necesario desarrollar nuevas tecnologías que permitan avanzar en nuevas terapias con el fin de proporcionar alternativas de tratamientos actuales que otorguen opciones funcionales de tratamientos.
En este estudio se observó que las muestras de población de edades entre los 16 a los 25 años presentan índices de proliferación celular en cultivo mayores que el resto de las edades, se ha sugerido que la taza de renovación de estas células aumenta en este periodo de vida, en el cual comienzan a emerger los terceros molares o tradicionalmente llamados "muelas del juicio", las cuales son extraídas ya sea por recomendación médica o por razones estéticas, por tal motivo pueden ser una fuente de células troncales mesenquimales aprovechable y de obtención no invasiva.

El potencial de las DPSC para diferenciarse hacia distintos linajes demuestra que éstas pueden formar, diversos tipos celulares bajo estímulos específicos de factores de transcripción y moléculas, se ha reportado que a partir de las DPSC se ha logrado reparar tejido nervioso y retina, también se ha logrado obtener por diferenciación cardiomiocitos y regeneración dentaria debido a su gran potencial osteogénico, además se han podido obtener células endocrinas pancreáticas. Por lo que son candidatas en perspectivas de aplicación en terapia celular y medicina regenerativa en enfermedades crónico degenerativas como diabetes mellitus, reparación de cartílago y terapia en enfermedad de Alzheimer al obtener células de tipo neuronal entre otros padecimientos [1], [3], [11],[13].

Las técnicas de cultivo y aislamiento de DPSCs deben ser estudiadas debido a la importancia de ofrecer la obtención de una cantidad eficiente de células indiferenciadas a partir de la pulpa dental utilizando medios de mantenimiento que disminuyan costos y que permitan mantener el fenotipo de las células, tal es su estado indiferenciado, por otra parte las técnicas de cultivo para acceder a la cámara pulpar deben garantizar que ofrezcan seguridad e higiene puesto que existe una gran cantidad de microorganismos bucales que son potencialmente un riesgo de contaminación en los cultivos celulares.

Por otra parte, es necesario contar con técnicas que permitan conocer el fenotipo de las células que se cultivan, en este trabajo, a través de técnicas de citometría de flujo se caracterizó las células obtenidas en cultivo, mediante el análisis de marcadores de membrana tal como lo sugiere la ISCT, ya que deben contar con características específicas que permita conocer su identidad puesto que existen poblaciones celulares en la pulpa dental que morfológicamente suelen confundirse con las células mesenquimales indiferenciadas, tal como fibroblastos, células progenitoras neuronales, entre otras.
En nuestro país es necesario el desarrollo de investigación en áreas como la terapia celular para ofrecer en un futuro nuevas terapias aplicadas a padecimientos crónicos.

REFERENCIAS

[1] T. Yasui, Y. Mabuchi, S. Morikawa, K. Onizawa, C. Akazawa, y T. Nakagawa, "Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential", pp. 1–10, 2017.
[2] M. La Noce *et al.*, "Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy", *J. Dent.*, vol. 42, núm. 7, pp. 761–768, 2014.
[3] B. Mead, A. Logan, M. Berry, W. Leadbeater, y B. A. Scheven, "Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair.", *Stem Cells*, pp. 61–67, 2016.
[4] R. O. L. José Carlos Jaime Pérez, Idalia Garza Veloz, "Células madre", *Med. Univ.*, vol. 9, núm. 36, pp. 130–40, 2007.
[5] K. M. K. Masthan, S. Leena Sankari, N. Aravindha Babu, y T. Gopalakrishnan, "Mystery inside the tooth: The dental pulp stem cells", *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 7, núm. 5, pp. 945–947, 2013.
[6] B. Yang *et al.*, "Application of stem cells in oral disease therapy: Progresses and perspectives", *Front. Physiol.*, vol. 8, núm. APR, 2017.
[7] M. Aljamie, L. Alessa, R. Noah, y L. Elsayed, "Dental Pulp Stem Cells , a New Era in Regenerative Medicine : A Literature Review", núm. June, pp. 155–163, 2016.
[8] M. Raoof *et al.*, "A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation.", *Dent. Res. J. (Isfahan).*, vol. 11, núm. 2, pp. 244–250, mar. 2014.
[9] S.-L. Lin *et al.*, "Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation", *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 34, núm. 4, pp. 302–308, oct. 2015.
[10] S. Gioventù *et al.*, *A novel method for banking dental pulp stem cells*, vol. 47. 2012.
[11] J. Jiang *et al.*, "Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells", *Stem Cells*, vol. 25, núm. 8, pp. 1940–1953, 2007.
[12] Y.-Y. Chen *et al.*, "Dental pulp stem cells express tendon markers under mechanical loading and are a potential cell source for tissue engineering of tendon-like tissue", *Int. J. Oral Sci.*, vol. 8, núm. 4, pp. 213–222, 2016.
[13] F. I. Young *et al.*, "Clonal Heterogeneity in the Neuronal and Glial Differentiation of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells", *Stem Cells Int.*, vol. 2016, 2016.

EFECTO DE LA HESPERIDINA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL (CTMCU) A CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA (CPI).

Sánchez-Gómez, I., Villa-García-Torres, L.S., Bravo-Madrigal, J., Flores-Hernández, F.Y., *Marino-Marmolejo, E.N.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad de biotecnología médico farmacéutica, Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, 44270 Guadalajara, Jal.

*Autor para correspondencia: emarino@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La hesperidina es un glucósido-flavonona encontrado en cítricos, principalmente de la naranja ordinaria y cítricos del género *citrus-rutacea*. Se ha reportado que sus metabolitos pueden regular la ruta de la fosfatidil-inositol 3-cinasa, la proteína cinasa activada por mitógenos y la ruta de beta-catenina, las cuales están implicadas en el desarrollo de las células beta pancreáticas, por lo que en este trabajo se adicionó la hesperidina a un proceso de diferenciación guiado por distintos factores para la obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales de cordón umbilical, para ofrecer una posible fuente terapéutica celular en enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, padecimiento caracterizado por una falta de insulina funcional debido a un daño en las células beta del páncreas, esta es una enfermedad que encabeza la lista de trastornos metabólicos con una creciente mortalidad, en México representa la primera causa de muerte, por ello la incorporación de la hesperidina al proceso de diferenciación surge como una alternativa para la búsqueda y evaluación de nuevas moléculas que pudieran ampliar la posibilidad de obtener un mayor rendimiento en la producción de insulina de las células obtenidas por diferenciación celular *in vitro.*

Palabras clave: Hesperidina; células troncales; diferenciación; insulina.

INTRODUCCIÓN

La hesperidina (30, 5, 9-dihidroxi-40-metoxi-7-Orutinosyl flavonona) es un glucósido-flavonona, que consta de una aglicona y un disacárido de rutinosa. Se encuentra abundantemente en las frutas cítricas (familia Rutaceae) y también se ha encontrado en plantas, como en los géneros *Fabaceae, Betulaceae, Laminaseae y papilionáceas*. Es un subproducto abundante de desecho de los procesos industriales del cultivo de naranjas, cítricos y producción de jugos de fruta, por lo cual su aislamiento es barato y se obtiene principalmente de la naranja ordinaria *aurantium* y otras especies del género *citrus-Rutaceae* [1], [2].

Se ha reportado en estudios *in vitro* e *in vivo* que la hesperidina, como flavonoide, podría participar en la regulación de la ruta de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa Akt activada por mitógenos y en la ruta de las MAP cinasas, así como las vías de señalización de Wnt/β-catenina. En estudios de diferenciación de células troncales del ligamento periodontal se ha descrito que la hesperidina en una dosis de10 µM actúa como inductor de diferenciación hacía linajes osteogénicos, es

decir, formación y regeneración de hueso mediante la alteración de la expresión de moléculas diana y los genes en respuesta a diversas condiciones micro ambientales. Uno de los metabolitos de la hesperidina, como lo es la hesperitina, está implicada en la vía de la PI3K (activación) y la vía de MAP cinasas mediante la activación de ERK 1/2 y AKT por lo que se cree que hesperidina puede tener un efecto similar a su metabolito [3]-[5].

En este trabajo se siguió el protocolo de diferenciación reportado por Fazel Sahraneshin y colaboradores en el 2014, para obtener células productoras de insulina (CPI) a partir de células troncales de cordón umbilical, sin embargo la incorporación de la hesperidina al protocolo de diferenciación hacia células productoras de insulina surge como una alternativa para la búsqueda y evaluación de nuevas moléculas que pudieran ampliar la posibilidad de obtener un mayor rendimiento en la producción de insulina de las células obtenidas por diferenciación celular *in vitro* con la finalidad futura de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el desarrollo de terapia de reemplazo celular con prospectivas de aplicación en el caso de la diabetes mellitus. ya que hasta hoy no se han encontrado protocolos que ofrezcan una eficiencia suficiente en la obtención de células beta funcionales y concentraciones de insulina producidas por las mismas que semejen acertadamente la producción de hormona que aporta una célula beta naturalmente.

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad que encabeza la lista de trastornos metabólicos con una creciente mortalidad, morbilidad y afecciones secundarias. En México representa la primera causa de muerte, por lo que se ha convertido en un objetivo de estudio en instituciones de salud en México y alrededor del mundo [6], [7].

En el caso particular de la DM, la generación de las células beta a partir de células madre humanas *in vitro* puede ser una fuente renovable por células de reemplazo que restituyan la función normal de los tejidos u órganos de forma más eficiente que a través de terapias convencionales como la administración de insulina exógena.

Actualmente la investigación se ha dirigido hacia la búsqueda de moléculas que favorezcan la expresión de genes que guíen el desarrollo de forma similar al proceso que experimentan los progenitores endocrinos pancreáticos en el desarrollo embrionario de forma natural, siguiendo tres transiciones indispensables para la madurez celular; comenzando con la formación del primordio pancreático, posteriormente la formación de endodermo definitivo, así como la progresión de progenitores endócrinos y finalmente la madurez celular [8]-[11].

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células troncales y preservación

Se cultivaron las células de cordón umbilical en botellas de cultivo, con medio basal para células troncales mesenquimales de cordón umbilical de la casa ATCC (2% FBS; 5 ng/mL rhbFGF; 5 ng/mL rhFGF ácido; 5 ng/mL EGF y L-Alanyl-L-Glutamina 2.4 mM) a una densidad de 5,000 células por cm^2, se incubaron a 37°C, 95% humedad relativa y 5% CO_2. Se procedió a realizar la expansión de estás sin rebasar una confluencia del 80%, para posteriormente contar con una reserva celular almacenada en crio-preservación en nitrógeno líquido.

Análisis de citotoxicidad de hesperidina por citometría de flujo

Con la finalidad de verificar que la dosis de 10 µM de hesperidina antes mencionada como inductor que se utilizaría para el ensayo de diferenciación no fuese citotóxica se realizó un análisis para verificar el efecto sobre las células troncales de cordón umbilical.

Se cultivaron una densidad de $5x10^5$ células por pozo en placas de seis pozos con distintas concentraciones de hesperidina (0, 0.1, 10, 100 y 1000 µM) se incubaron a 37°C, 95% humedad relativa y 5% CO2 por 72h. Después se colectaron con tripsina 0.025%. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se procedió a teñir las células para lo cual se utilizó un kit comercial de viabilidad BD™.

Se agregaron 4.0 µL de naranja de tiazol (TO) y 2.0 µL de ioduro de propidio (PI) a 2 mL de la suspensión celular. Se agitaron en vortex e incubaron por 5 min a 20-25°C, protegidos de la luz.
La muestra se leyó en el citómetro BD AccuriC6™ a una longitud de excitación del láser de 488 nm y los resultados se analizaron con el software BD CellQuest™. El TO emite fluorescencia a 512 nm y se detecta principalmente en los canales FL1 y FL2; el PI emite fluorescencia a 617 nm y se detecta principalmente en el canal FL3. Por lo tanto, la mejor discriminación entre población viva y muerta se encuentra al relacionar en la gráfica los canales FL1 vs FL3.

Protocolo de diferenciación a células productoras de insulina

Se realizaron los cultivos con una concentración celular de $1x10^5$ /mL por pozo, en placas de 6 pozos, utilizando distintas combinaciones de moléculas y medios para cada etapa siguiendo el protocolo de Fazel Sahraneshin y col. 2014, y propiciar así la correcta diferenciación:
Inicialmente se colocaron en medio DMEM, suplementado al 10% con suero bovino fetal, 0.1 mM de aminoácidos esenciales, 2 mM de L-Glutamina, activina A 100ng/mL y se incubó durante 24 horas.
Después se cambió el medio por DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal, 0.1 mM de aminoácidos esenciales, 2 mM de L-Glutamina y se incubaron por 24 horas más.
Posteriormente se adicionó 1 µM de ácido retinoico por 24 horas más. Obteniendo células de linaje endócrino-endodérmico.

Para la transición secundaria, se colocaron en medio DMEM 10% con suero bovino fetal, 0.1 mM de aminoácidos esenciales, 2 mM de L-Glutamina y bFGF10 ng/mL por 5 días más, con el fin de proporcionar las condiciones de crecimiento y diferenciación hacía células pancreáticas endócrinas.
Para finalizar el proceso, se realizó cambio de medio por DMEM/F12 suplementado con 0.1 mM de aminoácidos esenciales, 2 mM de L-Glutamina, 10 ng/mL de bFGF, ITS 1X, B27 1X, GLP-1 1 ng/mL y Nicotinamida 10 mM por 5 días.

Bajo este protocolo se formaron dos grupos de cultivo: sin la hesperidina y con ella. Para el grupo con hesperidina, ésta fue adicionada en cada una de las etapas de diferenciación.
La finalidad de este proceso es propiciar que la célula crezca en condiciones similares al que sigue en el desarrollo embrionario para la diferenciación pancreática.
Las células obtenidas se mantuvieron en condiciones de humedad relativa al 95%, CO_2 5%, 37°C para su análisis citoquímico posterior.

Análisis de insulina intracelular

Después del proceso de diferenciación en placa de seis pozos con cada uno de los grupos experimentales, las células se desprendieron con 300 µL de tripsina 0.025% inactivando posteriormente con medio. Se colectó la suspensión celular en un micro-tubo de 1.5 mL de fondo cónico, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, posteriormente se descartó el sobrenadante y añadió 100µL de solución 1:1 de metanol: acetona, con la finalidad de fijar y permeabilizar las células en un solo paso, se dejó esta solución durante 1 min, posteriormente se les añadió 500µL de PBS a los tubos y se centrifugaron inmediatamente a 1500rpm durante 2 min, luego se retiraron los sobrenadantes y se incubaron con solución de anticuerpo anti-insulina (*Alexa Fluor* 647 Mouse) la cual se preparó colocando 4µL de anticuerpo en 1000µL de PBS, después a cada tubo eppendorf de células se les colocó 200µL de solución de anticuerpo, se incubaron durante 1h protegidos de la luz en agitación constante a 90rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado colocando 800µL de PBS, se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 300µL de PBS. Las muestras se leyeron en el citómetro Accuri C6 BD en el canal FL-4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Stock de trabajo de células troncales de cordón umbilical (CU) ATCC:

Se realizó un stock celular de CU de la casa comercial ATCC lote: 63216949, aisladas a partir del tejido "Wharton's jelly".

Análisis de viabilidad con hesperidina

No se observaron efectos citotóxicos ni proliferativos a ninguna de las dosis probadas. La figura 1a muestra fotografías del crecimiento de las células bajo las distintas dosis. La morfología celular no presenta cambios. Por otra parte, el análisis del efecto de la hesperidina se muestra en las figuras 1b y 1c, en donde se representa por gráficos de puntos el análisis por citometría de flujo en el que se observan poblaciones divididas de células vivas y muertas o restos celulares, se observa que a diferentes dosis la hesperidina no ocasiona muerte celular, en la figura 1c se representan numéricamente los porcentajes correspondientes a cada grupo de células tratadas con las diferentes dosis de la hesperidina.

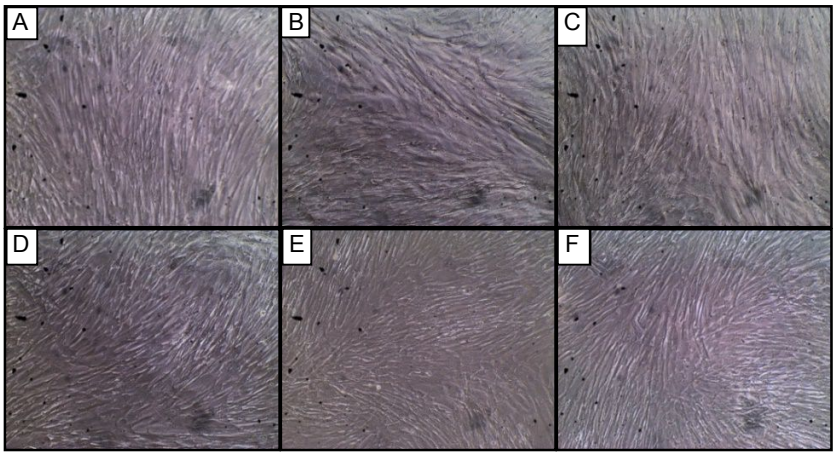


Figura 1a. Curva de citotoxicidad de hesperidina en células MSC de cordón umbilical (Aumento 40x). A) Células control sin hesperidina; B) Células con hesperidina 0.1 µM; C) Células con hesperidina 1.0 µM; D) Células con hesperidina 10 µM; E) Células con hesperidina 100 µM; F) Células con hesperidina 1000 µM.

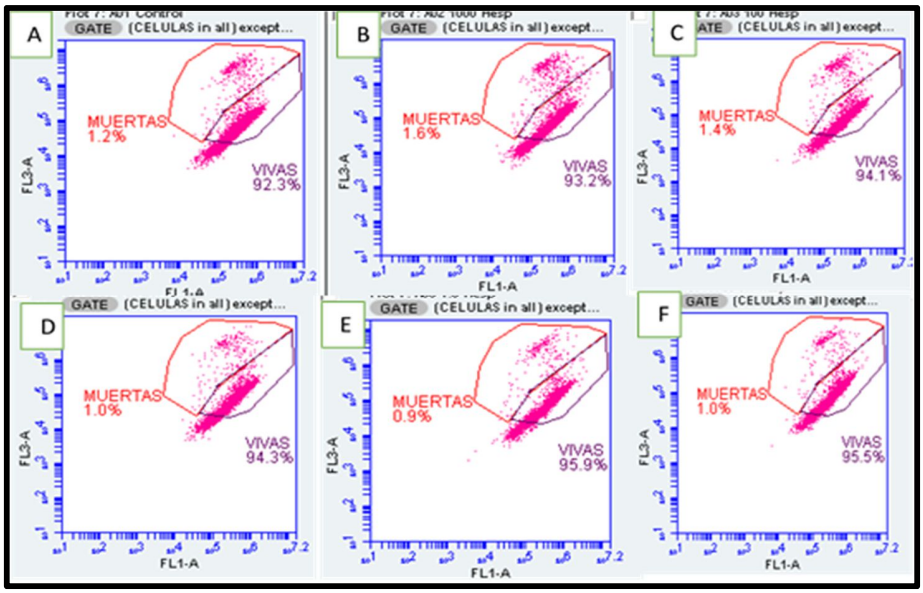


Figura 1b. Análisis por citometría de curva de citotoxicidad de hesperidina en células MSC de cordón umbilical. A) Células control sin hesperidina; B) Células con hesperidina 0.1 µM; C) Células con hesperidina 1.0 µM; D) Células con hesperidina 10 µM; E) Células con hesperidina 100 µM; F) Células con hesperidina 1000 µM.

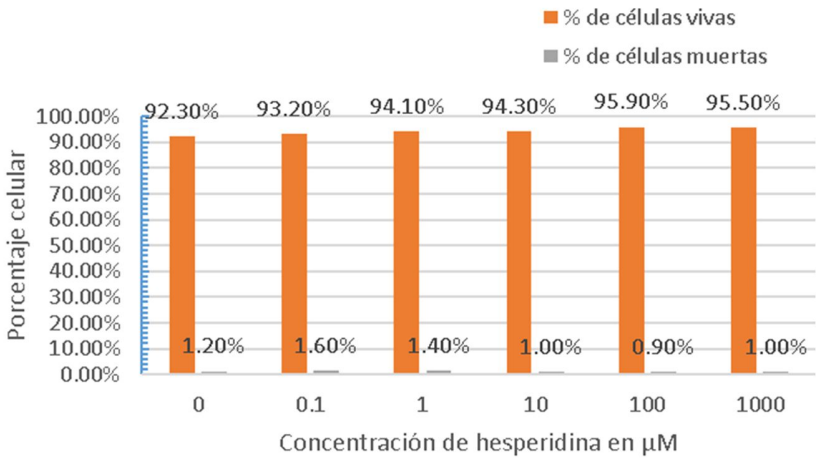


Figura 1c. Viabilidad celular con hesperidina.

Las barras en color anaranjado o porcentaje de células vivas no presentan cambios de comportamiento respecto de las dosis de la hesperidina, por lo cual no se observó efecto citotóxico de ésta molécula.

Análisis de insulina intracelular

Después del proceso de diferenciación, se realizó un análisis para verificar la presencia de insulina intracelular y analizar la influencia de la hesperidina sobre dicho proceso.

Los resultados se presentan en la figura 2. Se realizaron tres grupos experimentales los cuales fueron: A) Grupo control: células indiferenciadas marcadas con anticuerpo; B) Grupo de células diferenciadas; C) Grupo de células diferenciadas tratadas con hesperidina (10 µM).

El histograma A o control, tiene la función de ofrecer información sobre la auto-fluorescencia celular y posibles interferencias inespecíficas, con base a este control se delimita el punto de partida para verificar el desplazamiento hacia la derecha de los histogramas, de tal forma que nos indique el porcentaje de población celular positiva para insulina. El histograma B, muestra positividad para insulina en un 25% de población celular, este histograma representa células sometidas al proceso de diferenciación pero que no fueron tratadas con hesperidina. El histograma C, muestra células sometidas al proceso de diferenciación y que además se pusieron en contacto con la hesperidina, se observa un ligero incremento de la población positivas, siendo esta de un 30.3%, es decir, un aumento de un 5% respecto de las células que no se expusieron a la hesperidina, este aumento sugiere que la hesperidina podría beneficiar el proceso de obtención de CPI.

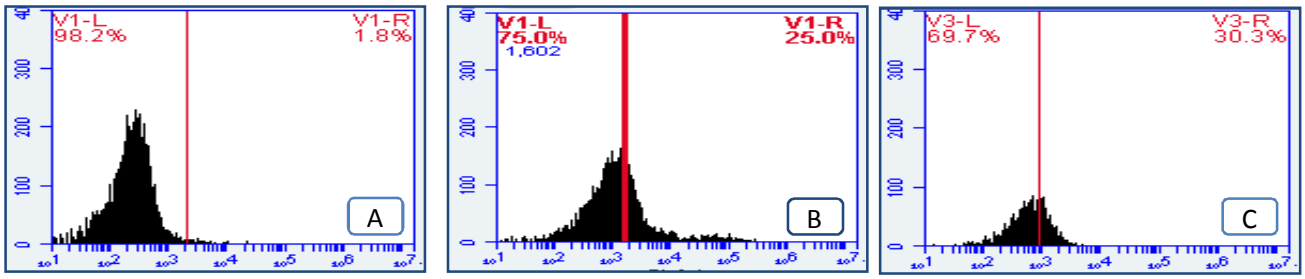


Figura 2. Histogramas del análisis de insulina intracelular por citometría de flujo. A) Grupo control: células indiferenciadas marcadas con anticuerpo; B) Grupo de células diferenciadas; C) Grupo de células diferenciadas tratadas con hesperidina (10 µM).

Algunos autores como Mahmoud M. y colaboradores en el 2015 han reportado alrededor de un 0.12-3.4% de obtención de CPI obtenidas bajo diversos protocolos y condiciones, sin embargo, bajo las condiciones de trabajo ya descritas en este trabajo, al encontrar un aumento de un 5% ce células positivas para insulina al añadir la hesperidina podría ser significativo en perspectivas futuras para el escalamiento de cultivos para la obtención de CPI, no obstante, es necesario continuar con el estudio para determinar el efecto de la hesperidina sobre la diferenciación o producción de insulina. De esta forma aprovechar esta molécula abundante en los procesos industriales del procesado de cítricos.

CONCLUSIONES

En este estudio de tipo exploratorio se observó que la hesperidina, un flavonoide abundante en desechos industriales del procesado de jugos de cítricos, es una molécula cuyo efecto citotóxico nulo y la tendencia a aumentar el porcentaje de CPI, pudiera ser incluida en protocolos de diferenciación que ofrezcan mayor eficiencia en la obtención de CPI con el fin de ofrecer alternativas para el desarrollo de nuevas terapias en el área de la medicina regenerativa. Se espera que la molécula, junto con las condiciones de microambiente de cada etapa, favorezca el proceso de diferenciación y se pueda obtener mayor biomasa (incremento en índice celular) y producción de insulina, incluyendo la hesperidina en un protocolo de diferenciación optimizado, para lo cual es necesario continuar con la investigación para confirmar el genotipo de las células y ahondar en estudios al respecto para lograr llegar a proponer una terapia.

REFERENCIAS

[1] S. Majumdar y R. Srirangam, "Solubility, Stability, Physicochemical Characteristics and *In Vitro* Ocular Tissue Permeability of Hesperidin: A Natural Bioflavonoid", Pharm. Res., vol. 26, núm. 5, pp. 1217–1225, may 2009.

[2] V. M. Nakajima, J. V. J. Madeira, G. A. Macedo, y J. A. Macedo, "Biotransformation effects on anti lipogenic activity of citrus extracts.", Food Chem., vol. 197 Pt B, pp. 1046–1053, abr. 2016.

[3] S. Y. Kim, J.-Y. Lee, Y.-D. Park, K. L. Kang, J.-C. Lee, y J. S. Heo, "Hesperetin Alleviates the Inhibitory Effects of High Glucose on the Osteoblastic Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells", PLoS One, vol. 8, núm. 6, p. e67504, jun. 2013.

[4] Y. O. Agrawal et al., "Hesperidin Produces Cardioprotective Activity via PPAR-γ Pathway in Ischemic Heart Disease Model in Diabetic Rats", PLoS One, vol. 9, núm. 11, p. e111212, nov. 2014.

[5] J. Nones, T. C. L. De Sampaio e Spohr, y F. C. A. Gomes, "Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival", Neurochem. Res., vol. 36, núm. 10, pp. 1776–1784, 2011.

[6] F. J. T. Massó, La Diabetes en la Práctica Clínica (eBook). 2014.

[7] Cifras estadísticas INEGI 2014. Recuperado de http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp.

[8] T. van der Meulen y M. O. Huising, "Maturation of stem cell-derived beta-cells guided by the expression of urocortin 3", Rev. Diabet. Stud., vol. 11, núm. 1, pp. 115–132, 2014.

[9] K. E. McGrath, A. D. Koniski, K. M. Maltby, J. K. McGann, y J. Palis, "Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4.", Dev. Biol., vol. 213, núm. 2, pp. 442–456, 1999.

[10] S. L. Ang et al., "The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins.", Development, vol. 119, núm. 4, pp. 1301–1315, 1993.

[11] M. Kanai-Azuma et al., "Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice.", Development, vol. 129, núm. 10, pp. 2367–79, 2002.

OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EN LA MULTIPLICACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO LÍTICO EN UN SISTEMA *in vitro*.

[1]Avalos-Salgado, F.A., [1]Quiñones-Aguilar, E.E., [1,2]Enríquez-Vara, J.N., [1,2]Guízar-González, C., [1]*Rincón-Enríquez, G.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Biotecnología Vegetal, Zapopan, Jalisco, México.
2. CONACYT- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Biotecnología Vegetal, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: grincon@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
La investigación se centró en la optimización de un método para la multiplicación de bacteriófagos líticos, a través de un sistema *in vitro*. Para esto, se definió el comportamiento biológico de la cepa huésped, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (BV865); identificando sus fases de latencia, exponencial y estacionaria. Posteriormente, se inoculó el bacteriófago (ΦXaF13) evaluado a través de la combinación de dos factores: 1) la concentración bacteria:bacteriófago y 2) las etapas del crecimiento bacteriano. El mejor tratamiento fue evaluado con dos nuevos factores: tiempos de incubación y velocidad de agitación. Finalmente, se validaron los parámetros donde se encontró la mayor concentración de bacteriófagos. Se encontró mayor concentración viral ($1x10^{11}$ UFP) en las condiciones de fase latencia, a una relación 10:1 bacteria:bacteriófago a 200 rpm y 24 h de crecimiento. El método desarrollado permitió obtener altas concentraciones virales.

Palabras clave: Bacteriófago; *Xanthomonas*; control biológico; curvas de crecimiento, mancha bacteriana.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, una de las mayores preocupaciones dentro de los ámbitos médico-farmacéutico y en la agricultura es la creciente aparición de cepas bacterianas multi-resistentes en contraste con el limitado desarrollo de una nueva generación de moléculas [1]. La aparición de dicho efecto se debe a la respuesta evolutiva por parte de los microorganismos ante el indiscriminado uso de agentes antimicrobianos, situación que trae como consecuencia mayores dificultades para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias. Bajo este contexto, en diferentes sectores de la sociedad surgen diversos impactos como: aumento de los costos relacionados con el padecimiento, pérdida por periodos mayores de tiempo de la fuerza de trabajo, pérdida de cultivos agrícolas, dando como resultado hambrunas generalizadas y la aparición de pandemias con un alto grado de mortalidad [2] [4].

Desde el punto de la vista clínico, las bacterias de interés que ya han presentado resistencia son: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *S. aureus* coagulasa negativo resistente a glicopéptidos, especies de *Enterococcus* resistentes a vancomicina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina,

Pseudomonas aeruginosa multi-resistente y *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente [1].

A nivel de la agricultura, la resistencia se enfoca principalmente a antibióticos y compuestos a base de cobre, que han sido los principales bactericidas usados para el control de enfermedades en campo. El cobre ha sido el bactericida más utilizado, sin embargo, se ha observado resistencia a él en varias bacterias fitopatógenas. Con respecto a los antibióticos, la estreptomicina ha sido usada extensamente para el control de enfermedades bacterianas, originando la emergencia de cepas resistentes. Las bacterias fitopatógenas de mayor importancia para este caso son las pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas, Ralstonia, Agrobacterium, Xanthomonas, Erwinia, Xylella, Pectobacterium* y *Dickeya* [5].

El desarrollo de nuevas moléculas ya no es una opción sustentable para poder superar esta amenaza biológica, en gran parte por su alto costo y por el tiempo que debe invertirse para que un producto sea liberado al mercado, por lo tanto, alternativa ampliamente eficaz es la utilización de bacteriófagos (fagos), virus depredadores de bacterias, como terapia complementaria en la clínica o biocontrol en campo. El fundamento de este interesante método de control, consiste en infectar una célula bacteriana con una partícula fágica, resultando típicamente en una rápida replicación viral seguida por la lisis de la bacteria junto con la liberación de una numerosa progenie de fagos, quienes continuaran el ciclo de igual manera, reduciendo las concentraciones de poblaciones bacterianas, resultando en un control seguro y biológico de la enfermedad [10].

El uso de bacteriófagos cuenta con ventajas y desventajas a ser consideradas para su desarrollo y aplicación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ventajas y desventajas del uso de bacteriófagos en el tratamiento de problemas bacterianos [3] [7].

Ventajas	Desventajas
Alta especificidad	Acción limitada a la bacteria blanco
Seguros para el hombre y el ambiente	Generación de resistencia
Capaces de traspasar el biofilme	Traspaso de genes horizontalmente
Auto replicables	Su uso no está legislado
Bajo costo de manufactura y almacenamiento	
Co-evolución con la bacteria	

El objetivo de esta investigación fue definir las condiciones necesarias de un sistema biológico "Bacteria-Bacteriófago" para poder establecer una metodología capaz de asegurar una alta concentración de virus, asegurando de esa manera la materia prima, independientemente de la fase en que se encuentre el proyecto. Sin embargo, debe tenerse siempre en cuenta que las condiciones a utilizar serán específicas a cada bacteria, por lo tanto, la replicación viral deberá ser pensada en el ciclo biológico de su huésped. La hipótesis de investigación fue: existe un método repetible, que asegure una alta concentración viral (>1x10^{10} partículas virales), utilizando como sistema biológico el huésped bacteriano *Xanthomona axonopodis* pv. *vesicatoria* (cepa BV865) junto con su fago, cuya actividad lítica ha sido previamente comprobada (ΦXaF13).

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología sigue lo descrito en las investigaciones realizadas por Solís *et al.* [6] y López [9].

Cultivo y cuantificación bacteriana de la cepa BV865

Se utilizó el medio rico NYG para el cultivo de la cepa bacteriana elaborado con peptona (5 g/L) extracto de levadura (3 g/L) y glicerol (20 mL/L), cuando se utilizó medio sólido se adicionaron 16 g de agar por litro y 7 g cuando se usó medio suave. Todas las muestras bacterianas fueron sembradas en medio líquido, dejadas en incubadora (30°C, 200 rpm) por una noche. Su concentración fue obtenida a partir de su densidad óptica a 600 nm, donde la absorbancia de 1 (OD_{600}) equivalió a $1x10^8$ UFC mL^{-1}. Del cultivo bacteriano se tomaron 100 µL y 900 µL de medio NYG para ser leída al espectro. Para determinar la curva de crecimiento bacteriano de la cepa BV865 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* se realizaron tres repeticiones independientes de cultivos con un crecimiento inicial de OD_{600} de 0.1, posteriormente se tomaron las absorbancias cada hora hasta las 24 h. Con estos datos se estimó la curva de crecimiento y a partir de ella se calculó el tiempo de generación de la cepa BV865 empleando la fórmula siguiente [11]:

$$G = \frac{t}{3.3\ log\frac{b}{B}}$$

Donde: G = tiempo de generación en h o min; t = intervalo de tiempo en h o min; B = número de bacteria al inicio del intervalo de tiempo; b = número de bacteria al final del intervalo de tiempo.

Cuantificación de la concentración viral del bacteriófago ΦXaF18

Se realizaron ensayos en doble placa para cuantificar la concentración viral en unidades formadoras de placa (UFP) por mL de cultivo empleado la técnica de doble placa en medio rico. De las muestras líquidas que contenían el virus a evaluar, se realizaron diluciones decimales seriadas. Posteriormente, de cada dilución se colocaron 5 µL sobre la placa doble agar, la cual se dejó en incubadora estática por 18-24 h a 30°C. El resultado se visualizó como la presencia de placas de lisis en el medio y se estimó la concentración viral en UFP mL^{-1}.

Experimento 1: Relación fase de crecimiento y concentración bacteria:bacteriófago

Se inoculó el bacteriófago ΦXaF13, junto con la bacteria (10 mL de medio líquido) en combinación de 3 niveles de 2 factores: Fases de crecimiento bacteriano [Latencia, exponencial y estacionaria] con relación a la concentración de bacteria-bacteriófago. La relación de concentraciones utilizadas fueron: 10:1, 1:1 y 1:10. Así mismo, las condiciones de incubación fueron de 30°C-200 rpm por 24 h. Cada combinación (tratamiento) fue realizada por triplicado y los datos fueron analizados mediante ANOVA y Tukey ($p \leq 0.05$).

Experimento 2: Tiempo de incubación (h) y velocidad de agitación (rpm)

El mejor tratamiento del experimento 1 fue elegido y empleado en este segundo experimento, donde se evaluaron 3 niveles de 2 factores: Tiempo de incubación [24, 48 y 96 h] con velocidad de agitación [50, 100, 200 rpm]. Las condiciones de incubación fueron de 30°C. Cada combinación (tratamiento) fue realizada por triplicado y los datos fueron analizados mediante ANOVA y Tukey ($p \leq 0.05$).

El mejor tratamiento de ambos experimentos fue replicado cinco veces y analizado estadísticamente (ANOVA y Tukey al 5% de significancia) para comprobar su repetitividad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de crecimiento bacteriano de la cepa BV865 y tiempo de generación

Los tiempos obtenidos de la curva de crecimiento se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Fases del crecimiento bacteriano.

Fase	Tiempo (h)
Latencia	0.5
Exponencial	4.5
Estacionaria	10

El tiempo de generación calculado a partir de la curva de crecimiento bacteriano fue de 75.6 minutos para la cepa BV865.

Experimento 1 y 2: Maximización de la producción de bacteriófagos

Los análisis estadísticos mostraron que las mejores condiciones de tratamiento fueron: fase de crecimiento bacteriano de latencia con una relación bacteria:bacteriófago 10:1. Consecuentemente, el segundo experimento demostró que para obtener la mayor concentración viral se requieren condiciones de crecimiento de 200 rpm por 24 horas. A su vez, la combinación de los dos mejores tratamientos fue replicada cinco veces para comprobar su validez. Los resultados se aprecian en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Resultados de los tratamientos

Tratamiento	Descripción	Concentración viral ($1x10^8$) UFP mL^{-1}
1) Relación bacteria:bacteriófago y fase de crecimiento	Relación 10:1 Fase: Latencia	2000*
2) Agitación y tiempo de incubación	Agitación de 200 rpm Tiempo 24 h	1000*
Comprobación (5 repeticiones)	-	1600*

*Estos tratamientos fueron analizados de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Conjuntando los resultados de los dos experimentos se determinó que las condiciones de crecimiento: fase latencia, a una relación 10:1 bacteria:bacteriófago a 200 rpm y 24 h de crecimiento fueron las mejores para maximizar la replicación viral.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que es posible establecer condiciones específicas para obtener la mayor cantidad de concentración viral de una manera reproducible. Esto se demostró al observar como repetidamente las condiciones: 24 h- relación bacteria:bacteriófago 10:1 – 200 rpm – fase de latencia, produjeron las concentraciones virales más altas en este estudio.

La relación entre bacteria-bacteriófago se explicaría con base en uno de los consensos de la biología viral donde son definidos parásitos intracelulares de las células, por lo tanto, su comportamiento se vuelve densodependiente. En consecuencia, entre mayor sea la concentración del huésped existe mayor probabilidad de contacto entre bacteria y bacteriófago para iniciar el proceso de replicación del

segundo; lo cual a su vez se ve ayudado por la alta agitación, donde al comparar el resultado de las tres velocidades evaluadas, la más alta demostró ser la más constante, lo cual lleva a pensar que una elevada agitación incrementa en gran medida la probabilidad de que el virus tenga un mayor contacto con su huésped. La fase de latencia de la bacteria fue la mejor para la inoculación del virus, pues aunque durante esta etapa la bacteria todavía no aumenta su concentración, se atribuye la alta replicación viral porque es cuando el huésped tiene mayor actividad metabólica, la cual se va perdiendo al cabo de 10 horas, por lo que en ningún otro momento el bacteriófago tiene la oportunidad de aprovechar la máxima capacidad de su huésped para tomar control y aprovechar el ímpetu biológico para la producción de más partículas virales. Investigaciones enfocadas en el incremento de la replicación de un bacteriófago en sistemas *in vitro* fueron realizadas a mediados del siglo pasado por Puck [12] y Sargeant [8]. El primero entrando en gran detalle en tratar de entender el mecanismo de absorción de los fagos junto con recomendaciones para asegurar un aumento en la cantidad total final a base de adicionar cationes al medio para abrir los poros de la bacteria por medio de cargas facilitando la tarea del fago; mientras que el segundo autor se enfoca en cómo se puede llevar a cabo la producción de fagos a gran escala; en este estudio es de interés su propuesta de añadir formol al medio para facilitar la absorción del fago por la bacteria. El siguiente paso a definir en investigaciones consecuentes, será el uso de diferentes aditivos que puedan aportar una mayor absorción dentro del proceso de replicación del bacteriófago, añadidos en la formulación del medio.

CONCLUSIONES

La emergencia de resistencia bacteriana a los antibióticos y productos agroquímicos a base de cobre, es una oportunidad de desarrollar terapias alternativas para el tratamiento de las enfermedades bacterianas de las plantas cultivadas. Una de éstas, es la utilización de bacteriófagos (fagos), virus depredadores de bacterias, como herramientas de control biológico de poblaciones bacterianas. Este estudio contribuye con el establecimiento de nuevas metodologías que permiten obtener altas concentraciones virales en el menor tiempo posible, asegurando el material viral para su uso en los diversos ámbitos científicos. Así en este trabajo se encontró que la fase de latencia; una concentración 10:1 (bacteria:bacteriófago); 200 rpm; 24 h de incubación a 30°C aseguraron concentraciones virales de $1x10^{11}$ UFP mL^{-1}.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de este trabajo por parte del proyecto "Nanobiocontrol inteligente de bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas*) de solanáceas de importancia agrícola en México" de la convocatoria de Problemas Nacionales (2015) (Clave CONACyT: 2015-01-338).

REFERENCIAS

[1] A. Smith, Bacterial resistance to antibiotics, (2007) Pharmaceutical microbiology, *Blackwell Science*, 7 ed, 220-232 capítulo 13.

[2] C. Anne, D. Dominey-Howes, M. Labbate, "The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences and management", (2014) Frontiers in Publich health, vol. 2, doi: 10.3389/fpubh.2014.00145.

[3] C. Buttimer, O. McAuliffe, R. Ross, C. Hill, J. O´Mahony, A. Coffey, "Bacteriophages and bacterial plant diseases" Frontiers in Microbiology (2017), Vol. 8.

[4] D. Denkenberger, J. Pearce, Feeding everyone no matter what, (2015) Academic Press, 5-16, ch 2.

[5] F. Iriarte, A. Obradovic, M. Wernsing, L. Jackson, B. Balogh, J. Hong et al., "Soil-bases systemic

delivery and phyllosphere *in vivo* propagation of bacteriophages". (2012) Bacteriophage 2:4, 215-224.

[6] G. Solís, E. Quiñones, G. Rincón, "Métodos de aislamiento y caracterización de bacteriófagos para el control biológico de bacterias fitopatógenas", (2017) En proceso de publicación.

[7] J. Jones, L. Jackson E., B. Balogh et al., "Bacteriophages for plant disease control"; Annu. Rev. Phytopathol. (2007) 45:254-262. Disponible en arjournals.annualreviews.org

[8] K. Sargeant, "Large-scale bacteriophage production" (1970) Advances in Applied Microbiology Vol. 13, 121-137.

[9] M. C. Lopez V., "Control biológico de la mancha bacteriana del cultivo de chile (*Capsicum anuum* L.) mediante bacteriófagos", Tesis de maestría Centro de investigación y asistencia en tecnología del Estado de Jalisco, A.C., 2016.

[10] R. Frampton, A. Pitman, P. Fineran, "Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens", International Journal of Microbiology (2012) doi: 10.1155/2012/326452

[11] T. Kenneth, "The growth of bacterial populations" Todar´s online textbook of bacteriology (2012) Disponible en http://textbookofbacteriology.net/growth_3.html

[12] T. Puck, A. Garen, J. Cline, "The mechanism of virus attachment to host cells" J Exp Med. 1951 Jan 1; 93(1): 65–88.

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA DE UNA PROTEÍNA TERAPÉUTICA: ERITROPOYETINA RECOMBINANTE HUMANA (rHuEPO).

[1a]Maldonado-Becerril, M., [1b]Rodríguez-González, J.A., [1b]Camacho-Ruiz, R.M., [1a]Canales-Aguirre, A.A., [1a]Esquivel-Solís, H., [1a*]Márquez-Aguirre, A.L.

1a. Unidad de Evaluación Preclínica, Biotecnología Médica y Farmacéutica.
1b. Unidad de Biotecnología Industrial
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, 44270, Guadalajara, Jal., Méx.

*Autor para correspondencia: amarquez@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
El desarrollo de formulaciones estables de proteínas terapéuticas es crítico para la seguridad y eficacia de los biofármacos. La determinación de impurezas se realiza como parte del control de calidad de los medicamentos biotecnológicos y para el cumplimiento de aspectos normativos y regulatorios. Estas pruebas incluyen la determinación de precursores, la presencia de productos de degradación, así como la agregación proteica, los cuales pueden surgir durante los procesos de producción o durante el almacenamiento de los medicamentos. La presencia de agregados en las formulaciones juega un papel importante debido a que las proteínas terapéuticas son susceptibles de agregación en respuesta de una gran variedad de inductores de estrés como son la temperatura, pH, agitación, ciclos de congelación-descongelación, agentes oxidantes, entre otros. Estos agregados intervienen en el rompimiento de la tolerancia del huésped tras la administración de un producto biofarmacéutico. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad fisicoquímica de una proteína terapéutica modelo: la Eritropoyetina Recombinante Humana (rHuEPO).

Palabras clave: rHuEPO; estabilidad fisicoquímica; agregación de proteínas, condiciones de estrés.

INTRODUCCIÓN

Los biofármacos, se producen mediante tecnología de DNA recombinante, por lo que requieren más que una simple demostración de bioequivalencia farmacológica para establecer la seguridad y la eficacia. La determinación de impurezas se realiza como parte del control de calidad de los medicamentos biotecnológicos y para el cumplimiento de aspectos normativos y regulatorios. Estas pruebas incluyen la determinación de precursores, la presencia de productos de degradación, así como la agregación proteica, los cuales pueden surgir durante los procesos de producción o durante el almacenamiento de los medicamentos debido a que las proteínas son susceptibles de agregación en respuesta a una gran variedad de inductores de estrés por la acción de la luz, temperatura (calentamiento y ciclos de congelación-descongelación), cambios extremos de pH, interacción con excipientes o con el mismo envase en el que se almacena, etc. [1][2].

La agregación de proteínas se ha reconocido cada vez más como un problema que limita la eficacia y la vida útil de las proteínas terapéutica, así como el causante de numerosos estados patológicos. Los agregados de proteína se pueden definir como cualquier especie no nativa física o químicamente unida de dos o más monómeros de proteína. Generalmente, se clasifican en dos grandes grupos: agregados solubles, que se encuentran en un rango de 1 a 100nm y agregados no solubles, de 0.1-100µm [3]. Sin embargo, existe otra clasificación; según su tipo de enlace, en covalentes o no covalentes, según su formación, en reversibles o irreversibles, y por último, en lineales (agregados ordenados) o amorfos (agregados desordenados), según su ordenamiento [4]. Generalmente, los agregados de proteína inicialmente son solubles pero gradualmente comienzan a ser insolubles conforme exceden en su tamaño y límites de solubilidad (Figura 1) [2].

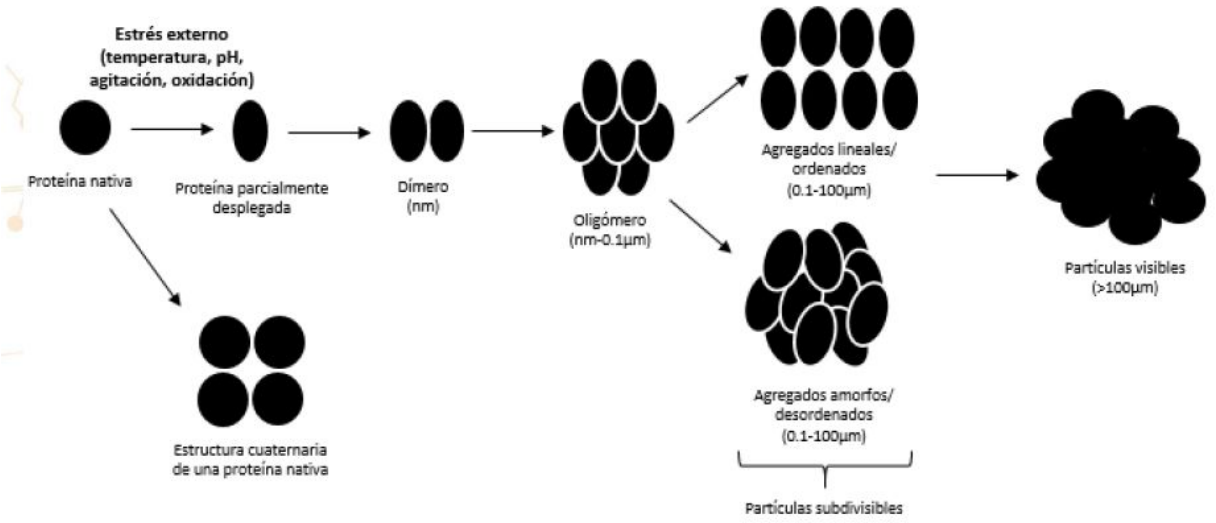


Figura 1. Modelo esquemático de la agregación de proteínas.

El grado de agregación de una proteína depende de muchos factores que pueden clasificarse como factores intrínsecos (estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria) o extrínsecos (ambiente en el que la proteína está presente, condiciones de procesamiento, etc.) [2]. Las proteínas se agregan a través de diferentes mecanismos, los cuales se pueden dividir en: Agregación a través de intermediarios desplegados o estados desplegados (Mecanismo 1), Agregación a través de la auto asociación de proteínas (Mecanismo 2a) o enlaces químicos (Mecanismo 2b) y Agregación a través de degradaciones químicas (Mecanismo 3) (Figura 2) [2].

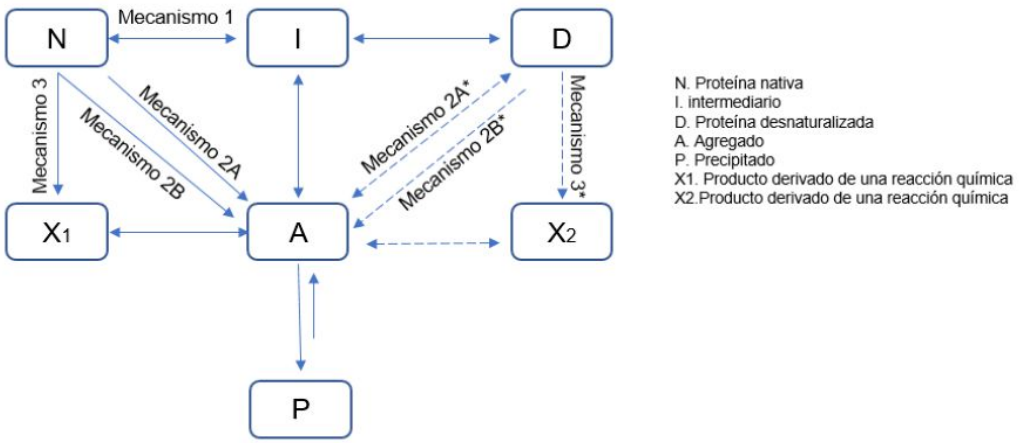


Figura 2. Agregación mediante estados de desplegamiento y estados desplegados de intermediarios (Mecanismo 1). La proteína nativa en solución está en equilibrio con una pequeña cantidad de intermediarios (I) desplegados y también pueden estar en estado desplegado (D), estos a su vez pueden ser precursores de los procesos de agregación. Agregación mediante auto asociación de proteínas (Mecanismo 2A). Las proteínas pueden asociarse físicamente a agregados de proteínas provenientes de la proteína nativa, mediante asociaciones electrostáticas o hidrofóbicas o ambas. Agregación mediante enlaces químicos directos (Mecanismo 2B). Las degradaciones químicas forman una red con las cadenas de las proteínas conduciendo a la agregación. La reacción de reticulación más común es la formación de enlaces disulfuros. Agregación mediante degradación química (Mecanismo 3). Muchas vías de degradación química han demostrado aumentar la tendencia de agregación de proteínas, como la oxidación, dimerización, hidrolisis, desaminación, etc. Otros mecanismos de agregación (Mecanismo 2A*, 2B*, 3*). Las proteínas que se encuentran en estado desplegado de forma natural pueden formar agregados de forma directa (mecanismo 2A*). El estado desplegado de una proteína también puede sufrir degradación química y formar agregados directamente (mecanismo 2B*) o indirectamente (mecanismos 3*).

En términos del proceso de agregación física, sugiere que los intermediarios plegables o desplegables de proteínas poco poblados son precursores del proceso de agregación. Esto se debe a que estos intermediarios exponen sus regiones más hidrofóbicas y tienen mayor flexibilidad con respecto al estado plegado. Esto es lo que ocurre cuando una proteína se expone a cambios de temperatura, como son los ciclos de congelación-descongelación, provocando la formación de interfaces hielo-agua que interaccionan con la proteína exponiendo sus regiones hidrofóbicas, o temperaturas altas que inducen el desplegamiento parcial o total de la proteínas, por el rompimiento de enlaces, provocando la 5 agregación[5][6][4]. La agitación es otro factor que hace que aumente la interfase aire/agua que está disponible, facilitando el despliegue y/o la agregación mediada por la superficie. (Figura 2, mecanismo 1). Así también, los cambios de pH alteran los estados de ionización de las cadenas laterales de aminoácidos, lo que induce un despliegue parcial o completa de la proteína, haciéndola susceptible a la formación de agregados (Figura 2, mecanismo 2A). Existe también las modificaciones químicas como la oxidación y desaminación que provocan cambios estructurales en la proteína (Figura 2, mecanismo 2B y 3) [6]. Sin embargo, las temperaturas altas pueden también causar la dimerización de las proteínas, seguido de la formación de agregados de alto peso molecular (Figura 2, mecanismo 3).

Debido a la susceptibilidad de las proteínas a agregarse debido a diversos factores que se encuentran dentro de las etapas de producción, almacenamiento y manejo de productos biotecnológicos, muchos

de los productos proteicos que se formulan a concentraciones bajas de biofármaco, como es la Eritropoyetina Recombinante Humana, contienen excipientes tales como la albumina humana para reducir la degradación y la agregación de proteínas. Sin embargo, existe la posibilidad de que la Albumina Humana también forme agregados de proteínas disminuyendo de igual manera la calidad y eficacia del producto biotecnológico [11].

Aunque existen diversos estudios en los que se ha documentado que medicamentos biotecnológicos como la somatropina, y los interferones α y β, forman agregados mediante ciclos de congelación-descongelación, cambios de pH, calentamiento, agitación y oxidación catalizada por un metal [3], [7], [8]. En el caso de rHuEPO, se ha demostrado la formación de agregados solubles inducidos por tungsteno en jeringas precargadas. [9], [10]. Sin embargo, se desconoce la formación de agregados de rHuEPO inducidos por el sometimiento de la proteína a condiciones límite. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es evaluar la estabilidad fisicoquímica de una proteína terapéutica modelo: la Eritropoyetina Recombinante Humana (rHuEPO) bajo condiciones de estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medicamento

Se evaluó una formulación comercial de rHuEPO: Exetin A®, de laboratorios PiSA en presentación de 2000 U/ml.

Equipos

Zetasizer nanoz90; Cromatógrafo Äkta ™ pure; Eppendorf Thermomixer R Mixer.

Métodos

Formación de agregados mediante inductores de estrés

Para ello, un medicamento comercial de rHuEPO (Exetin-A® de 2000 UI/ml) se dializó mediante filtros Amicon 0.5ml 10kDa para eliminar su diluyente. Posteriormente se diluyeron en PBS pH 7, en una dilución de 1:100, para someterlo a condiciones de estrés. Para la condición de agitación, la muestra se agitó a 400 rpm durante 16 h protegido de la luz en un Thermomixer R de la marca Eppendorf. Para la condición de cambios de temperatura, se calentó la muestra a 74°C durante 15 min, protegido de la luz y se realizaron ciclos de congelación-descongelación, congelando la muestra a -80°C durante 20 minutos y descongelando a 25°C durante 20 minutos, protegido de la luz. Para la condición de cambios de pH, las muestras se diluyeron en buffers, en una dilución 1:100, preparados de acuerdo a la Farmacopea Europea a diferentes pH (2, 4, 6, 8, 10) durante 6 semanas.

Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE y PAGE)

La estimación del peso molecular de los agregados proteicos se realizó mediante SDS-PAGE y PAGE con poliacrilamida al 12%, en condiciones no reductoras, con tinción con Azul de Coomassie, conforme al procedimiento previamente descrito por Amber Haynes Fradkin *y cols. (2009)*.

Cromatografía de exclusión molecular (FPLC-SEC)

Con esta técnica se realizó la identificación de oligómeros. Se utilizó la columna HiPrep Sephacryl 16/60 S-200 HR en un equipo FPLC Äkta pure marca GE®. Las fracciones obtenidas se concentraron mediante filtros Amicon 0.5ml 10kDa y se cuantificaron mediante un kit DC de BioRad®. La determinación de la

formación de oligómeros se realizó conforme al procedimiento previamente descrito por Amber Haynes Fradkin *y cols. (2009) y Vasco Fillipe y cols (2012)*.

Dispersión dinámica de luz (DLS)
Con esta técnica se determinó el tamaño de los agregados (nm y kDa) mediante Zetasizer nanozs90, calculada a partir de las mediciones de luz en función de fluctuaciones de luz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Durante la producción y almacenamiento de medicamentos biotecnológicos se forman compuestos de alto peso molecular, que pueden ser dímeros o polímeros de proteína, debido a cambios de pH, temperatura, exposición a la luz, etc. Estos compuestos pueden ser una de las principales causas de diversos estados patológicos, como es el caso de la inmunogenicidad. Por esta razón, se deben llevar a cabo estrictos análisis para comprobar que un producto biotecnológico es seguro. El análisis consiste en realizar una caracterización molecular mediante cromatografía de exclusión molecular (FPLC-SEC) para cuantificar monómeros, dímeros, agregados y potenciales degradantes y SDS-PAGE para determinar pesos moleculares de los mismos, entre otras técnicas [1].

En este trabajo, se realizó cromatografía de exclusión molecular para la determinación de oligómeros y remoción del agente estabilizante del producto biotecnológico (Exetin-A®), donde se observó la presencia de dos fracciones en un volumen de elusión de 0.30 VC y 0.40 VC con una absorbancia promedio de 8.38 (F1) y 88.31 (F2) respectivamente. En la cromatografía de exclusión molecular, las proteínas de mayor peso molecular eluyen en seguida de la inyección de la muestra y posteriormente eluyen las de menor peso [12]. Por esta razón, es posible que la primera fracción sea un complejo de HSA/EPO, debido a que este complejo tiene un peso molecular mayor al de las dos proteínas por separado (~80 kDa) [13], la cual eluyó a los 62.5 minutos y la segunda fracción a los 108 minutos.

Posteriormente, esto se confirmó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida, bajo condiciones reductoras y con tinción con azul de Coomassie, para la determinación del peso molecular de las proteínas presentes en el medicamento. Todas las muestras presentaron dos bandas, una mayoritaria de ~50 kDa y una minoritaria de ~30 kDa, que demuestra la presencia de HSA y EPO respectivamente. Por último, se realizó un Western Blot de las fracciones obtenidas del FPLC utilizando un anticuerpo Anti-HSA a una dilución 1:2000. Se observa la presencia de HSA en las dos fracciones (Figura 3).

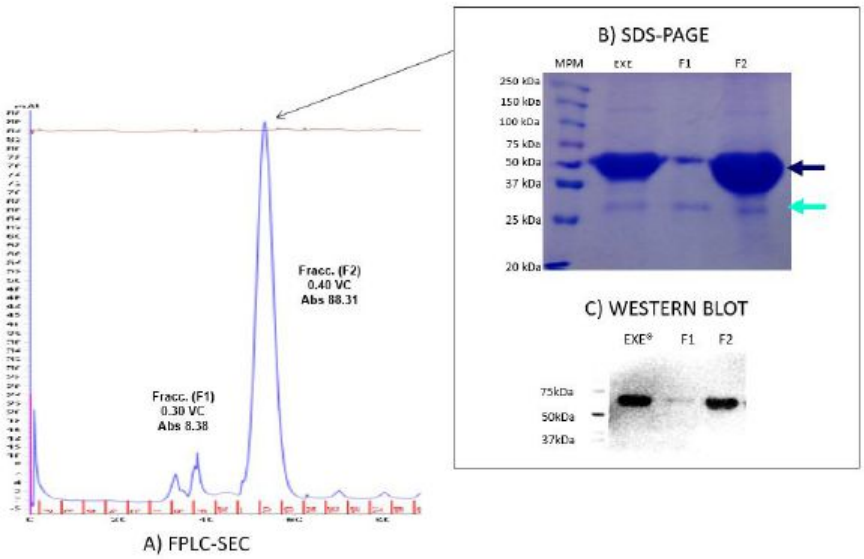


Figura 3. A) Cromatografía de exclusión molecular (FPLC-SEC). Perfil cromatográfico del biotecnológico de prueba (Exetin-A) con la columna HiPrep Sephacryl 16/60 S-200 HR. Los picos fueron colectados e identificados como fracciones 1 y 2. Posteriormente se concentraron utilizando membranas de corte de 10 kDa. B) SDS-PAGE en condiciones reductoras tinción con Coomassie de Exetin-A y las fracciones recuperadas de FPLC-SEC. Se observa la presencia de una banda mayoritaria en ~50 kDa y una banda minoritaria a ~30 kDa. C) Western Blot. Las muestras provenientes del FPLC (F1 y F2) fueron analizadas para detectar la presencia de albúmina humana (HSA) utilizando un anticuerpo Anti-HSA dil. 1:2000.

Formación de agregados mediante inductores de estrés

Las proteínas terapéuticas son susceptibles a agregación en respuesta de una gran variedad de factores de estrés con lo que se encuentran durante su manufactura, almacenamiento y uso de los pacientes. Por lo tanto, los estudios a condiciones de estrés pueden ser útiles para determinar si las exposiciones accidentales a condiciones distintas de las propuestas son perjudiciales para el producto. En este estudio, se sometió a condiciones de estrés para la formación de agregados un medicamento biotecnológico mediante exposición a cambios extremos de pH, cambios de temperatura (calentamiento y ciclos de congelación-descongelación) y agitación. Las muestras se analizaron mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS) en un equipo Zetasizer nanoz90 para la medición de partículas en nm y mediante PAGE y SDS-PAGE para la medición de partículas de mayor tamaño. En el Zetasizer, en la Figura 4A, se puede observar la muestra sin ningún tipo de estrés. En la Figura 4B, observamos la presencia de dos picos que demuestran la formación de agregados de mayor tamaño, 220 nm y 1.82 x10(8) Da de peso con una intensidad del 86.3 % en la muestra sometida a 10 ciclos de congelación y descongelación. Mientras que para la muestra que se sometió a calentamiento, se observa la degradación del producto debido a la formación de partículas de menor tamaño (28.21nm), con una menor intensidad (35.1 %) y con 1.50x10(6) Da de peso molecular (Figura 4C). En cambio, con la muestra que se sometió a agitación pudimos observar que con la combinación de cambio de diluyente del medicamento a PBS y la agitación, se logran ver partículas de peso molecular similar al de HSA (6.84x10(4) Da) y EPO (3.44x10(4) Da) y con intensidades de 46.3 % y 51.3 % y tamaños de 7.53 nm y 5.61 nm, respectivamente, mas no se observa la formación de agregados de gran tamaño (Figura 4D). Posteriormente se realizó PAGE en condiciones reductoras y se observaron dos bandas en todas las muestras, una mayoritaria de ~60 kDa, que

corresponde a HSA y una banda minoritaria en ~110 kDa, que podría corresponder a un agregado de EPO (Figura 4E).

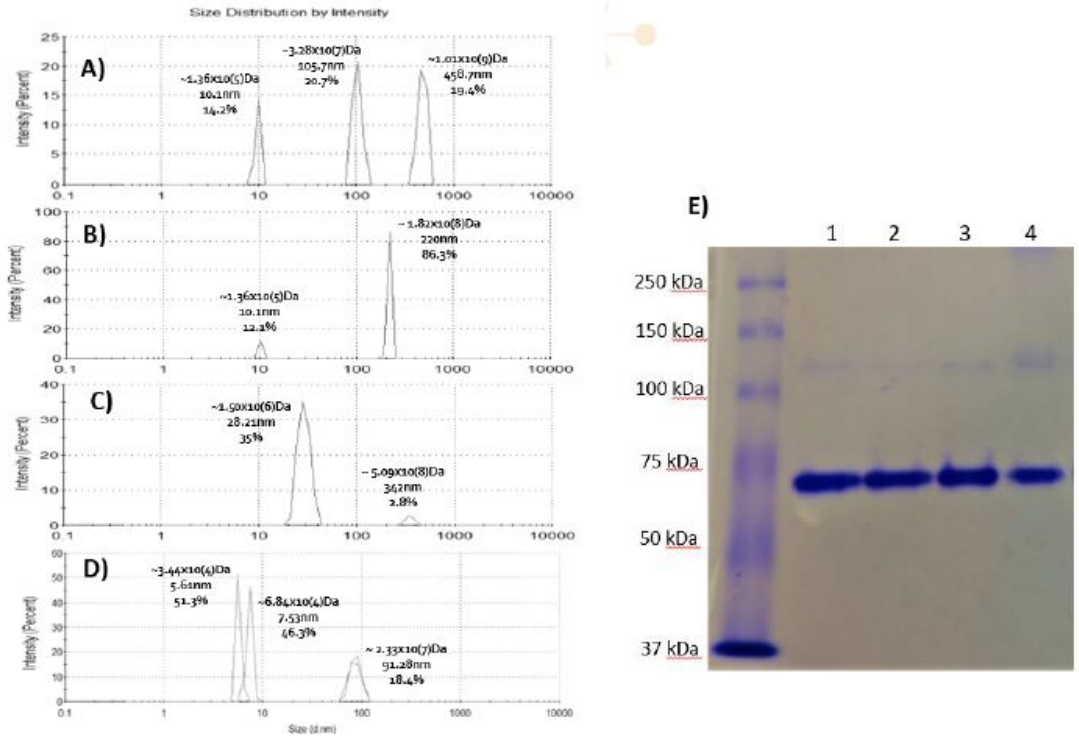


Figura 4. Distribución de tamaño por intensidad y peso molecular (Da) y patrón electroforético de Exetin-A. A) Exetin-A®, muestra control sin ningún tipo de estrés. B) Exetin-A® estresado mediante ciclos de congelación (-80ºC durante 20 minutos) y descongelación (25ºC durante 20 minutos). C) Exetin-A® estresado mediante calentamiento durante 15 minutos a 74ºC. D) Exetin-A® estresado mediante agitación durante 16 horas a 14,000rpm. E) PAGE en condiciones no reductoras tinción con Coomassie de Exetin-A (1) y las muestras estresadas mediante agitación (2), ciclos de congelación y descongelación (3) y calentamiento (4). Se observa la presencia de una banda mayoritaria en ~60 kDa y una banda minoritaria a ~110 kDa.

Por último, las muestras que se sometieron a diferentes pHs, también se analizaron mediante Zetasizer cada semana durante 6 semanas y en la sexta semana se analizaron mediante electroforesis con gel de acrilamida al 12 % y 8 %. En la Figura 5A, se observa la muestra a pH 7 como control. A pHs alcalinos se observó la presencia de partículas de mayor intensidad en la quinta semana de incubación a pH 8, con 58.7 nm y 8.31x10(6) Da con un 80.6 % de intensidad (Figura 5B). Para pH 10, se observó la formación de partículas de 105.7 nm y 3.28x10(7) con una intensidad del 33.3 % en la sexta semana (Figura 5C), resultado de la formación de agregados. En cambio, a pHs ácidos se observó la presencia de partículas de mayor tamaño desde la primera semana de incubación a pH 2 con 342 nm y 5.1x10(8) Da con una intensidad de 65.4 % (Figura 5D). Mediante SDS-PAGE, con geles de poliacrilamida al 12 %, en las muestras a pHs ácidos se observaron bandas de 50, 100 y 150 kDa mientras que a pHs básicos se observaron bandas de 37, 50,10 0kDa (Figura 6). Las bandas de 100 y 150 kDa podrían corresponder a un agregado de EPO, sin embargo, queda pendiente caracterizar esos agregados para saber si corresponden a agregados de eritropoyetina o de albumina.

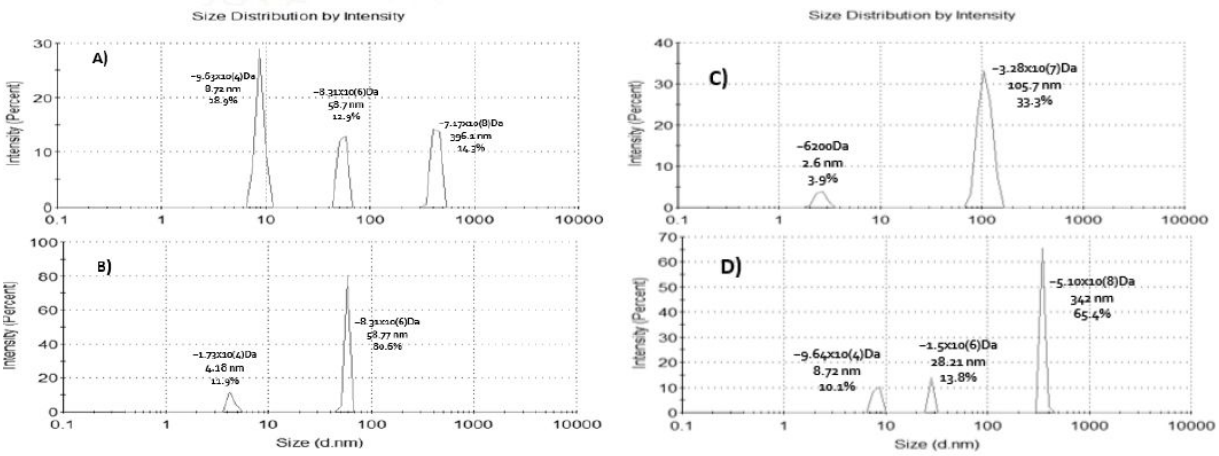


Figura 5. Distribución de tamaño por intensidad y peso molecular (Da) de Exetin-A. A) Exetin-A®, muestra control a pH 7. B) Exetin-A® con 5 semanas de incubación a pH 8. C) Exetin-A® con 6 semanas de incubación a pH 10. D) Exetin-A® con 1 semana de incubación a pH 2.

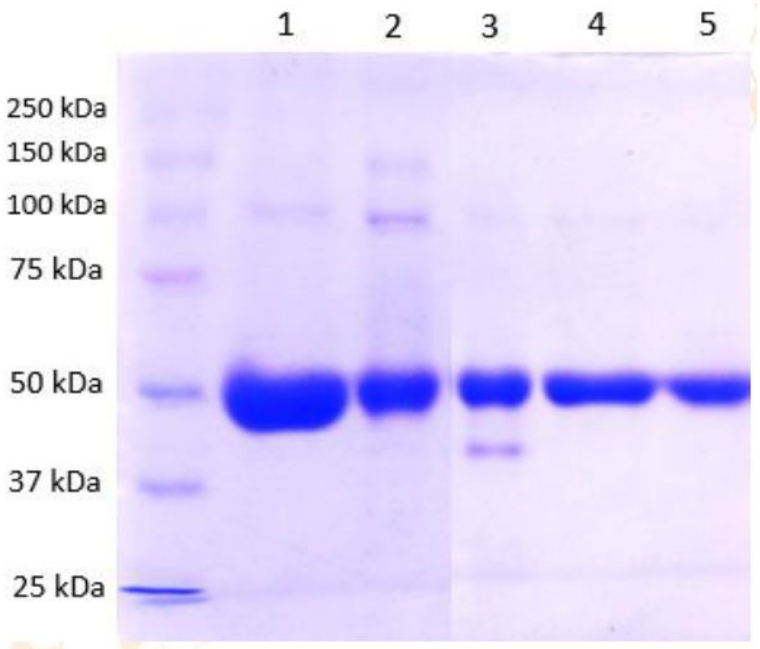


Figura 6. SDS-PAGE en condiciones no reductoras tinción con Coomassie de Exetin-A (1) y las muestras estresadas mediante pH 2 (2), muestra control a pH 7 (3), pH 8 (4) y pH 10 (5). Se observa la presencia de una banda mayoritaria en ~50 kDa y bandas minoritarias a 37, 100, 150 kDa.

CONCLUSIONES

Si bien no es posible utilizar la cromatografía de exclusión para la separación total de eritropoyetina de su agente estabilizante, debido al complejo que se forma entre ellas y a la proporción en la que se adiciona dicho agente estabilizante (100:1) en la formulación comercial, el FPLC-SEC puede ser utilizada para identificar formas agregadas de la proteína por lo que resulta ser una herramienta útil para el control de calidad de medicamentos biotecnológicos. En este estudio, analizamos la muestra mediante cromatografía antes de someterla a estrés para asegurarnos de que no tuviera la presencia de formas agregadas. Posterior al estrés, los resultados demuestran una pérdida en la estabilidad del medicamento a través de la formación de agregados, sin embargo, la albúmina de suero humana (excipiente) presente en esta formulación, podría interferir en la formación de los mismos.

REFERENCIAS

[1] ICH Expert Working Group, "ICH Guideline Q6B," *Specif. Test Proced. Accept. Criteria Biotechnol. Prod.*, no. March, pp. 1–20, 1999.

[2] W. Wang, S. Nema, and D. Teagarden, "Protein aggregation-Pathways and influencing factors," *Int. J. Pharm.*, vol. 390, no. 2, pp. 89–99, 2010.

[3] W. Wang, S. K. Singh, N. Li, M. R. Toler, K. R. King, and S. Nema, "Immunogenicity of protein aggregates — Concerns and realities," *Int. J. Pharm.*, vol. 431, no. 1–2, pp. 1–11, 2012.

[4] K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, and I. Kimber, "Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation," *J. Immunotoxicol.*, vol. 11, no. 2, pp. 99–109, 2014.

[5] S. K. Singh, "Impact of Product-Related Factors on Immunogenicity of Biotherapeutics," *Int. J. Drug Dev. Res.*, vol. 3, no. 2, pp. 26–33, 2010.

[6] V. J. Voet Donald, *Biochemistry*. 2011.

[7] A. H. Fradkin, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Immunogenicity of Aggregates of Recombinant Human Growth Hormone in Mouse Models," vol. 98, no. 9, pp. 3247–3264, 2009.

[8] V. Filipe, W. Jiskoot, A. H. Basmeleh, A. Halim, H. Schellekens, and V. Brinks, "Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice," *MAbs*, vol. 4, no. 6, pp. 740–752, 2012.

[9] B. Sharma, "Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 2: Impact of container closures," *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 3, pp. 318–324, 2007.

[10] A. Seidl *et al.*, "Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 6, pp. 1454–1467, 2012.

[11] M. Christie, D. Peritt, R. M. Torres, T. W. Randolph, and J. F. Carpenter, "The Role of Protein Excipient in Driving Antibody Responses to Erythropoietin," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 12, pp. 4041–4055, 2015.

[12] GE Healthcare, "Size exclusion chromatography: Principles and Methods," *GE Heal. Handbooks*, p. 139, 2012.

[13] L. A. Halim *et al.*, "How bio-questionable are the different recombinant human erythropoietin copy products in Thailand?" *Pharm. Res.*, vol. 31, no. 5, pp. 1210–1218, 2014.

GENOTOXICIDAD DEL CIGARRO ELECTRÓNICO (14 MG DE NICOTINA) EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN: ESTUDIO PRELIMINAR.

[1]Ayala-Hernández, B.L., [2]Gutiérrez-De-Velasco-Barrera, I.G., [3]Brito-Torres, A.E., [4]Armijo-Gómez, J.A., [5]Zavala-Aguirre, J.L., [6*]Torres- Bugarín, O.

1. Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California Norte, México
2. Facultad de Ciencias Químicas y Biológicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, México.
3. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, 45129 Zapopan, JAL, México.
4. Residente de pediatría, Benemérito Hospital General con Especialidades Juan María De Salvatierra, Baja California Sur, México.
5. Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, México.
6. Laboratorio de Evaluación de Genotóxicos del Programa Internacional de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, 45129 Zapopan, JAL

*Autor para correspondencia: oliviatorres@hotmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

El cigarro electrónico (*e-cig*) es un dispositivo cuyo objetivo es sustituir el uso de tabaco. Los e-líquidos contienen: glicerina, propilenglicol y nicotina, el vapor posee sustancias tóxicas de las cuales se conoce su efecto nocivo. Por esto, es apremiante tener técnicas que estudien la genotoxicidad, lo cual podemos evaluar con la prueba de micronúcleos. Dado que el *e-cig* está sustituyendo al cigarro convencional es necesario desarrollar este estudio controlado para calcular los riesgos genotóxicos de su uso. Determinar la genotoxicidad del *e-cig* mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratón expuestos a vapor de *e-cig* a concentración de 14 mg de nicotina. Se formaron dos grupos de siete ratones. El grupo control no se expuso al vapor, el grupo tratado se expuso cinco días, cuatro veces con intervalos de dos horas, a dosis de 0.5 ml de e-líquido con concentración de 14 mg de nicotina por administración. El vapor se obtuvo del dispositivo mediante una jeringa, cada ratón permaneció en la cámara de gases durante un minuto, donde se suministró el vapor. A cada ratón se le tomaron cinco muestras en exposición, y tres post-exposición, se fijaron en etanol al 80% por 10 minutos, se tiñeron con anaranjado de acridina y se analizaron al microscopio con epifluorescencia. No se encontraron diferencias significativas en EPC y EPCMN entre grupos, los EMN mostraron mayor frecuencia en el grupo expuesto (p=0.0001). No se observó citotoxicidad. El efecto genotóxico es evidente y demuestra perdida de material genético.

Palabras clave: Cigarro-electrónico, micronúcleos, ratón.

REFERENCIAS

[1] Pereda Solís, M. E., Martínez Guerrero, J. H., Salazar Borunda, A. M., Bujdud León, A. N., Carillo Gómez, C. S. Ecología y Salud de la Fauna Silvestre: Avances de investigación. 1er edición. México: Ujed editorial; 2017. 29 pag.

[2] Ponciano Rodríguez, G., Pliego Rosas, C. El cigarro electrónico mitos y realidades. Revista digital universitaria. Abril 2016. Vol. 17. Núm. 4.

[3] Torres Bugarín, O., Zavala Cerna, M. G., Macriz Romero, N., Flores García, A., Ramos Ibarra, M. L. Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. El residente. 2013 abril; Vol. 8, Núm. 1.

EFECTO DE DIFERENTES TIPOS DE ONDAS ELÉCTRICAS EN LA RAPIDEZ DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE.

[1]Zerecero-Núñez, J.A., [2]Navarrete-Manzo, M.C.

*Autor para correspondencia:

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN
El propósito principal de esta investigación es exponer de qué manera afectan tres diferentes tipos de señales a bajas y altas frecuencias a la coagulación de la sangre. Primero se presenta el proceso de armado del circuito, el cual, en sus salidas brinda los tres tipos de señales; cuadrada, senoidal y triangular. Después, estas señales fueron introducidas directamente a la sangre por medio de dos cables: voltaje y tierra, por intervalos de tiempo determinados. Tras realizar dos rondas de pruebas se descubrió que las ondas eléctricas sí pueden llegar a tener un efecto relativamente notable en la coagulación sanguínea.

Palabras clave: Sangre, coagulación, frecuencias, generador de señales.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA EN PLASMA.

[1]Acevedo-Medrano, J.L., [2]Rubio-Arellano, E.D., [2]Fajardo-Robledo, N.S., [3*]Romero-Tejeda, E.M.

1. Universidad de Guadalajara, Departamento de Química, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, México 44430.
2. Universidad de Guadalajara, Departamento de Farmacobiología, Laboratorio de Investigación y Desarrollo Farmacéutico, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, México 44430.
3. Universidad de Guadalajara, Departamento de Farmacobiología, Área de Farmacometría Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, México 44430.

*Autor para correspondencia: elba.romero@academicos.udg.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
La FDA aprobó una estrategia para tratar el transtorno de la apnea con la administración de metilxantinas, siendo la cafeína una de ellas, en donde la dosis aplicada de dicho fármaco es de 10 mg/Kg como impregnación y de 2.5 mg/Kg/día como mantenimiento. Por el momento no es posible recomendar el uso profiláctico con metilxantinas para evitar la apnea en el recién nacido prematuro porque no se cuenta con estudios clínicos aleatorizados o un meta-análisis en prematuros menores de 34 semanas de gestación. Recientemente, el IMSS realiza un tratamiento basado en las concentraciones de cafeína aplicadas para el tratamiento de la apnea del prematuro. Desafortunadamente el estudio aún no cuenta con suficientes avances en resultados ya que falta hacer aún mayores diagnósticos para realizar un mejor ajuste de dosis, a partir de la monitorización de las concentraciones del fármaco en el paciente. Esto permite llevar un control de las concentraciones alcanzadas y de su respuesta terapéutica. Para reportar una concentración de cafeína después de ser administrada una dosis de tal fármaco, se requiere del desarrollo de métodos analíticos confiables y reproducibles que brinden resultados que permitan monitorizar las concentraciones del activo en fluidos biológicos de pacientes, contribuyendo de manera efectiva en el tratamiento de éste tipo de afecciones en población vulnerable.

Palabras clave: Cafeína; Monitorización; Validación; Apnea

INTRODUCCIÓN
Los derivados de las xantinas son la cafeína, la teofilina, la teobromina y varios derivados sintéticos relacionados, todos ellos con propiedades farmacológicas similares pero con diferencias considerables en cuanto al grado de sus efectos sobre diversas estructuras. Por lo tanto, durante la utilización terapéutica de estos fármacos por un motivo especifico en el cual en este caso se utilizara para el tratamiento de la apnea, es posible minimizar los efectos adversos e intensificar el efecto deseado, siendo la cafeína la droga con mayores beneficios reportados [1], aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos). Siendo ya aplicado este método en el IMSS. [2]

La cafeína es una xantina de origen natural presente en el café, utilizada como estimulante del sistema nervioso central o respiratorio al incrementar los niveles de adrenalina y noradrenalina. Se emplea en el tratamiento de pacientes que sufren de episodios apneicos, alcanzando concentraciones plasmáticas y terapéuticas de 2-25 mg/L en adultos. Para la reducción de los episodios apneicos en pacientes prematuros, las concentraciones van de 13-25 mg/L llegando a incrementarse hasta niveles de 26-40 mg/L, en donde se ha comprobado que dosis superiores a 20 mg/L comienzan a provocar efectos adversos en el paciente y en donde concentraciones letales se consideran a partir de 100 mg/L. [1] y [3]
En pacientes prematuros es crítico llevar un control de las concentraciones plasmáticas alcanzadas ya que la vida media de la cafeína en dicha población puede llegar a alcanzar más de 100 horas. La vida media más prolongada en los neonatos se debe a un metabolismo mucho más lento de la droga por la inmadurez del sistema enzimático P450. [3]

Por lo tanto para utilizar la cafeína con fines terapéuticos en nacidos prematuros es necesario corregir la frecuencia de la dosis en forma apropiada, personalizar el tratamiento y monitorear las concentraciones plasmáticas alcanzadas, por dichos motivos se propone desarrollar y validar una metodología analítica en donde se obtengan resultados sensibles, específicos y reproducibles que considere volúmenes no mayores a 500 microlitros de plasma del paciente, esto por los inconvenientes que suelen presentarse en población pediátrica durante la toma de muestras.

Para el propósito de la validación del método, es necesario obtener respuestas analíticas sin interferencias entre la cafeína y el plasma mediante el cual se determinará principalmente el rango de trabajo así como el porcentaje de recobro obtenido después de ser tratada la muestra.

Para realizar dichas pruebas se siguen los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013 que indica los criterios y requisitos para la validación de métodos en fluidos biológicos con fines de demostrar la intercambiabilidad de medicamentos. Como documento oficial más cercano actualmente en materia de cuantificación de fármacos en muestras biológicas, el presente trabajo se apegó a las condiciones y requisitos establecidos en ella. [4]

Los niveles de cafeína en el plasma humano se han determinado principalmente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ya que dicho fármaco tiene la capacidad de absorber a una longitud de onda máxima de 274.0 nm en el cual los tiempos de respuesta son muy rápidos. [5]

Se retaron diferentes metodologías referenciadas en artículos en donde variaban las concentraciones de las soluciones amortiguadoras, el pH, las proporciones de la fase móvil, longitudes de onda y los rangos de cuantificación sin obtener los resultados esperados ya que todos presentaban interferencias con el principio activo. [5] y [6]

En el presente estudio, un método cromatográfico HPLC de fase inversa fue validado mediante el uso de plasma humano, para determinar el rango de cuantificación, selectividad, así como la precisión y la exactitud como porcentaje de recobro de cafeína en los niveles terapéuticos en plasma. El método fue aplicado con éxito para conocer los rangos de trabajo en los cuales las respuestas analíticas siguen manteniendo proporcionalidad lineal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la metodología se partieron de condiciones reportadas en artículos en donde una vez realizadas de manera experimental, no se obtuvieron buenos resultados ya que se presentaron interferencias entre la cafeína y el plasma, cabe mencionar que dichas metodologías no contenían las pruebas necesarias para ser consideradas como validadas ante la NOM-177-SSA1-2013, por lo que se comenzó a desarrollar una nueva metodología bajo diferentes condiciones para posteriormente validarla.

La nueva metodología desarrollada considera la precipitación de proteínas plasmáticas en donde se probaron diferentes tipos de solventes y ácidos a distintos porcentajes, siendo con ácido perclórico al 30% (v/v) el que proporcionó mejores resultados tanto en la precipitación como en la no degradación de la cafeína, posteriormente se probaron diferentes temperaturas y tiempos de congelación, esto con el fin de asegurar la precipitación de las proteínas, en donde se obtuvieron mejores resultados fue a una temperatura de ultracongelación (-70°C) durante 30 minutos, para después proceder a la separación del sobrenadante por medio de centrifugación en la cual se realizó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se procedió con la decantación de la muestra para posteriormente finalizar con el filtrado (nylon 0.45 micras) para su colocación en viales y posterior análisis en el cromatografo de líquidos.

Para la detección y cuantificación del fármaco en el plasma, se realiza una solución estándar de cafeína a 30 mg/L aforados en fase móvil, el análisis cromatográfico se lleva a cabo en un equipo Agilent Technologies serie 1120 con detección Uv-Vis. La fase móvil se compone de Acetonitrilo: Solución Amortiguadora de Fosfato Monobásico de Potasio 0.01 M pH 3.5 (10:90) a un flujo de 1 mL/min, columna Zorbax Eclipse de fase reversa C18, 4.6 mm X 150.0 mm, tamaño de partícula 5.0 µm a una longitud de onda de 274nm, con un volumen de inyección de 10.0 microlitros y 10 minutos de corrida.
Una vez desarrollada la metodología en donde se demostró la no interferencia entre la cafeína y el plasma así como la precisión, exactitud y repetibilidad del método, se comenzó a trabajar con la validación del método, de acuerdo a los parámetros marcados en la NOM-177-SSA1-2013. Para la soluciones del Sistema se trabajó con soluciones madre de cafeína a una concentración de 30 mg/mL aforados en fase móvil.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las metodologías reportadas no cuentan con el respaldo de una validación del método mismo que es indispensable considerando a el grupo etario que se considera analizar, por tanto se requiere seguir los lineamientos descritos por normas oficiales como para el análisis de muestras biológicas: NOM-177-SSA1-2013.

Optimización del estado cromatográfico

Bajo condiciones experimentales óptimas en las que se trabajó con una fase móvil de Acetonitrilo : Solución Amortiguadora de Fosfato Monobásico de Potasio 0.01 M pH 3.5 (10:90) , una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y una longitud de onda de 274 nm se obtuvieron respuestas analíticas bien definidas en donde la cafeína presento un tiempo de retención de 6.7 minutos dentro de una corrida analítica de 10 minutos dando valores de resolución mayores de 3 entre los picos que presentaba la matriz biológica y la cafeína, así como factor de capacidad con valores superiores a 3.5 para el fármaco de interés.
Determinadas las condiciones de trabajo, se obtuvieron diferentes resultados analíticos de la validación.

Adecuabilidad del Sistema
Es la verificación de que el sistema opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico en donde se obtuvieron respuestas reproducibles, reportándose un CV de 0.083 %.

Precisión del Sistema
Es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico, en donde se prepararon muestras por sextuplicado a una concentración de 29.520 mg/L de cafeína, obteniendo respuestas reproducibles, reportándose un CV de 0.559%.

Linealidad del Sistema
Es la capacidad (a diferentes rangos) para obtener resultados directamente o por transformación matemática bien definida, que son proporcionales a la concentración del compuesto por analizar dentro del intervalo de trabajo establecido. En donde se evaluaron 5 puntos de la curva de calibración demostrando linealidad con un valor de r^2>0.98 en un rango de 5.0 a 30.0 mg/L.

Límite de detección
Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones de operación establecidas, en donde se obtuvieron resultados para cafeína de 0.02 mg/mL con una variación de 0.86%.

Límite de cuantificación
Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas, en donde se obtuvieron resultados para cafeína de 1 mg/mL con una variación de 0.53%.

Selectividad
Capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra, en los cuales la cafeína no mostro interferencia con la matriz biológica utilizada.

Exactitud y Repetibilidad del Método
Mide la concordancia que existe entre un valor determinado experimentalmente y el valor verdadero. Se expresa como el porcentaje de recobro. En donde la cafeína presento un porcentaje de recobro de 101.64% y un CV de 2.40% con lo cual se demuestra que cumple con el parámetro marcado en la NOM-177-SSA1-2013 en el cual menciona porcentaje de recobro entre 85 y 115% y CV no mayor a 15%.

Estabilidad analítica de la muestra en solución
Mide las respuestas analíticas del activo en solución después de un rango de tiempo determinado posterior a la preparación inicial; en la muestra de cafeína se preparó la solución inicial dando porcentaje de recobro de 100.13% para posteriormente volver a ser inyectada cinco días después obteniéndose un recobro de 99.10% por lo cual cumple con los parámetros de similitud entre las dos respuestas.

CONCLUSIONES

El método descrito, combinando el uso de un procedimiento simple de precipitación de proteínas plasmáticas y plasma, proporciona resultados con muy buenos porcentajes de recobro y bajos coeficientes de variación para los niveles de cafeína en plasma en el rango terapéutico.
El desarrollo de la metodología para cuantificar cafeína en plasma, cumple con los criterios de la NOM-177-SSA1-2013.

Esta técnica ha demostrado ser rápida, selectiva, precisa y exacta para la monitorización de las concentraciones de cafeína en plasma humano y tiene sensibilidad suficiente para cuantificar niveles séricos como los esperados en pacientes prematuros.Es importante realizar monitoreos de dicho fármaco en pacientes prematuros ya que hasta el momento no se tienen estudios que demuestren la eficacia de dicho tratamiento.

La metodología desarrollada y validada, ha demostrado sensibilidad suficiente, además de ser una técnica rápida y de bajo costo para llevar a cabo la monitorización de cafeína en pacientes.
En la validación se emitieron resultados parciales ya que aún no se cuenta con todos los resultados de estabilidades analíticas de la muestra.

REFERENCIAS

[1] A. Gennaro "Remington Farmacia", Panamericana, Tomo. 2, 20a Edición pp. 1749-1751.
[2] Diagnóstico y Tratamiento de APNEA DEL PREMATURO, Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-724-14
[3] C. Tavares, R. K. Sakata. "Cafeína para el Tratamiento del Dolor", Elsevier, Vol. 62, pp. 387-401.
[4] Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, NOM-177-SSA1, 2013.
[5] S. N. Alvi, M. M. Hammami. "Validated HPLC Method for Determination of Caffeine Level in Human Plasma using Synthetic Plasma: Application to Bioavailability Studies", Journal of Chromatographic Science, Vol. 49, pp. 292-295.
[6] V. Nour, I. Trandafir, M. E. Ionica "Chromatographic determination of caffeine contents in soft and energy drinks available on the Romanian market", Vol. 11, 2010, pp. 351-358.

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER HEREDADA.

[1]Hernández-Sapiéns, M.A., [2]Cevallos-Ricardo, R., [1]Reza-Zaldívar, E.E., [1]Gutiérrez-Mercado, Y.K., [1]Márquez-Aguirre, A.L., [1]Esquivel-Solís, H., [1]Padilla-Camberos, E., [2]Gazarian, K., [1*]Canales-Aguirre, A.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Biotecnología Médica y Farmacéutica, Av. Normalistas 800, Jardines Alcalde, Guadalajara Jalisco, México C.P. 44270
2. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas Nueva Sede, Circuito Zona Deportiva 54, Coyoacán Ciudad de México, México C.P. 04510.

*Autor para correspondencia: acanales@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento neurodegenerativo que se caracteriza por la sobreproducción de la proteína β-amiloide y la hiper-fosforilación de la proteína tau; estos eventos derivan en la muerte neuronal y posteriormente en trastornos cognitivos. Actualmente, el desarrollo de modelos celulares *in vitro* de esta patología utilizando la tecnología de las células troncales pluripotentes inducidas ha tomado relevancia. Estos modelos pueden ser utilizados para el estudio *in vitro* de la patogénesis, para probar compuestos con potencial terapéutico, así como para su aplicación en medicina regenerativa de manera paciente-específico. En este trabajo se generaron y caracterizaron dos líneas de células troncales pluripotentes inducidas: una a partir de fibroblastos de un paciente con la forma heredada de la enfermedad de Alzheimer, y otra a partir de fibroblastos normales (sin mutación). Ambas líneas fueron generadas mediante vectores lentivirales con los factores de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4 y Myc. Las líneas generadas mostraron la expresión endógena de genes de pluripotencia y fueron expandidas por 13 pases de manera estable. Así mismo, mostraron la capacidad de silenciar los transgenes inducidos y de diferenciación hacia linaje neural. Con estas líneas se implementará un modelo para utilizarlo en un *screening* de compuestos con potencial farmacológico.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer; iPSC; Factores de reprogramación; modelo de la enfermedad de Alzheimer.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los padecimientos crónicos neurodegenerativos más comunes y conduce a la pérdida progresiva de habilidades cognitivas, cambios en el comportamiento, un declive del aprendizaje y en última instancia a la muerte [1]. Neuropatológicamente, la EA se caracteriza por la sobreproducción de la proteína beta amiloide 1-40/1-42 y su acumulación a manera de placas amiloides alrededor de las neuritas, además de la formación intracelular de pares de filamentos helicoidales hiper-fosforilados de la proteína tau en las neuronas. La sobreproducción de la proteína beta amiloide se origina por escisiones proteolíticas aberrantes, realizadas por las enzimas β- y γ-secretasa sobre la proteína precursora amiloide (PPA). Existen dos variantes de la EA; la esporádica, con un origen no definido, y donde la edad es el principal factor de riesgo; y la heredada, causada por

mutaciones en al menos uno de los genes PPA, PSEN1 y PSEN2. Los genes PSEN codifican para las proteínas presenilina 1 y 2, quienes forman parte del complejo γ-secretasa que escinde a la PPA. Las mutaciones en las presinilinas promueven una mayor actividad del complejo de la γ-secretasa, lo que conduce a una mayor liberación de las especies neurotóxicas de la proteína beta amiloide [2].

El reciente progreso de las técnicas de reprogramación celular y el uso de plataformas celulares han ampliado el horizonte en el modelado y estudio de distintas enfermedades como la de Alzheimer. La reprogramación celular consiste en la conversión de una célula somática, hacia una célula pluripotente, mediante la inducción de la expresión de factores de transcripción conocidos como factores OSKM (OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc). Estos factores promueven la transcripción de genes que confieren un estado de pluripotencia, así como también inhiben genes asociados a la diferenciación. Las células resultantes son conocidas como células troncales pluripotentes inducidas o iPSC, con capacidad de diferenciación hacia cualquier linaje celular del organismo adulto [3].

En investigaciones como la de Yagi y col. 2011, demuestran que al generar neuronas a partir de iPSC obtenidas de pacientes con la EA, éstas secretan β-amiloide. De igual manera, Israel y col. 2012, y Kondo y col. 2013, demostraron que las neuronas derivadas de iPSC obtenidas a partir de individuos con distintos trastornos neurodegenerativos (como la EA), exhiben características similares a la enfermedad, como la degeneración neuronal y la expresión de las proteínas patológicas [4-6]. Así mismo, se ha demostrado el potencial de la tecnología de iPSC en el descubrimiento de compuestos con potencial farmacológico [4, 7], pero hasta la fecha no se ha descrito en la literatura el estudio de algún compuesto en particular en neuronas derivadas de iPSC. Sumado a esto, la posibilidad de utilizar células somáticas del paciente para generar células pluripotentes presenta una oportunidad real para la aplicación de estas estrategias de manera personalizada [8, 9].

En México, los primeros trabajos en torno a células troncales se iniciaron en los años 90´s y se enfocaron en la biología y la influencia de diferentes factores en la diferenciación y sobrevivencia de las células troncales hematopoyéticas de cordón umbilical, células troncales neurales del mesencéfalo, células troncales embrionarias, entre otras [10]. Sin embargo, en México no existen estudios en reprogramación celular relacionada con la EA. Por esto, en el presente trabajo se tuvo como objetivo generar una línea de iPSC a partir de fibroblastos de un paciente con la EA heredada con el objetivo de utilizarlas en el modelado de la enfermedad y el *screening* de compuestos con potencial terapéutico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la reprogramación celular se utilizaron fibroblastos humanos con la mutación A246E en el gen PSEN1 (donados por Coriell Institute for Medical Research; AG07768) y fibroblastos humanos sin mutación. Las líneas de iPSCs fueron obtenidas mediante transducción de los fibroblastos con vectores lentivirales con los factores de reprogramación (OSKM; OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC).

Cultivo celular

Los fibroblastos de ambas líneas celulares fueron cultivados en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y antibiótico a 10 µg/ml. Fueron incubados a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5%, con cambio de medio cada 48h para su expansión.

Generación de vectores lentivirales

Para la generación de los vectores lentivirales, se transfectaron células 293T con los plásmidos: de envoltura, pCMV-VSV-G; de empaque, psPAX2; de transferencia, pSIN4-CMV-K2M, pSIN4-EF2-O2S; y el reportero pLENTI-CMV-GFP-puro. A las 12, 24 y 36 h posteriores a la transfección, el medio fue colectado y filtrado a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.45 µm. Posteriormente se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Prueba de infectividad

Para comprobar la capacidad infectiva de los vectores lentivirales, se utilizó el gen reportero GFP con pLENTI-CMV-GFP-puro. Para ello se sembraron fibroblastos en una placa petri de 6cm a una concentración celular de $1x10^4$ cel/cm^2 – $3x10^4$ cel/cm^2. Al momento de la infección se retiraron 2 ml de medio y se adicionaron 2ml de virus. A las 20 h de infección se retiró el medio de cultivo con el virus y se adicionó medio fresco, se observó la fluorescencia a las 24 y 48 h.

Reprogramación celular

La infección de reprogramación se realizó utilizando vectores lentivirales con los factores de reprogramación (OSKM; OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC) en placas petri de 6 cm con una densidad celular de $1x10^4$ cel/cm^2 – $3x10^4$ cel/cm^2. Se retiraron 2ml de medio y se agregaron 2ml de cada vector. A las 20 h de infección se retiró el medio de cultivo con el virus y se adicionó medio fresco. Al día 6 post-infección, los fibroblastos fueron subcultivados en placas de 6 pozos tratadas con matrigel a una densidad celular de 1.2 x 10^4 cel/cm^2. Al día 7 post-infección se cambió el medio de fibroblastos por medio Essential 8 y se incubó a 37°C y 5% de CO_2, con fotodocumentación y cambio de medio diario. Después de 24 días post-infección se realizó el aislamiento de colonias manualmente y se transfirieron a placas de 48 pozos tratadas con matrigel. Se realizaron pases cada 4-5 días con colagenasa IV. Se consideraron al menos 10 pases para determinarlas como líneas de iPSC establecidas.

Prueba de actividad de la fosfatasa alcalina

Se realizó la prueba de la actividad de la fosfatasa alcalina al día 25 post-infección utilizando el reactivo Sigmafast™ BCIP®/NBT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para esto, se retiró el medio de cultivo de las iPSC, se hizo un lavado con buffer tris fosfato (TBS 1x) y se agregó la solución Sigmafast. Se incubó de 15-20 min a temperatura ambiente (TA); transcurrido este tiempo, se quitó el reactivo, y se realizó un enjuague con buffer de fosfato salino (PBS), y finalmente se agregó nuevamente PBS para realizar la realizó la foto-documentación.

RT-PCR para determinar el silenciamiento de los transgenes y la expresión de genes endógenos de pluripotencia

El RNA total fue extraído utilizando RNeasy Mini Kit y cuantificado por espectrofotometría. La transcripción inversa se realizó utilizando el kit OneStep RT-PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la amplificación por PCR se utilizaron los primers descritos en la tabla 1. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la amplificación de los transgenes y de los marcadores de pluripotencia por RT-PCR.

Primer	Forward Reverse
GA3PDH	5´ AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA 3´ 5´ AATGAAGGGGTCATTGATGG 3´
OCT3/4	5´ GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG 3´ 5´ CCTCCAACCAGTTGCCCCAAACTCCC 3´
NANOG	5´ GGACACTGGCTGAATCCTTCC 3´ 5´ CTCGCTGATTAGGCTCCAACC 3´
O2S transgene	5' CAGTGCCCGAAACCCACAC 3' 5' GCTCGTCAAGAAGACAGGGCCA 3'
K2M transgene	5' CAAGTCCCGCCGCTCCATTACCAA 3' 5' GCTCGTCAAGAAGACAGGGCCA 3'

Identificación de marcadores de pluripotencia por inmunofluorescencia

Se realizó una inmunofluorescencia para la identificación de marcadores específicos de pluripotencia. Las iPSC se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min a TA, se hicieron 3 lavados con PBS. Para la detección de los marcadores nucleares y de superficie, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: SOX2 (Abcam, 1:2000), Nanog (Cell signaling; 1:400), OCT4 (Abcam; 1:1000), TRA-1-60 (Abcam; 1:1000), y SSEA4 (Abcam, 1:1000). Las células fueron permeabilizadas y bloqueadas de manera simultánea con Triton-x100 al 0.3% en PBS1x con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 1h a TA. Se hicieron 3 lavados con PBS. Se incubaron los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa 488 anti ratón (1:1000) y Alexa 546 anti conejo (1:200). Los anticuerpos secundarios fueron incubados por 2h protegidos de la luz a TA. Los núcleos de las células fueron teñidos con Hoechst durante 10 minutos. Se realizó un lavado con PBS y se foto-documentaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71) y el programa QuickCapture.

Diferenciación neural de iPSC

La inducción neural de las líneas se realizó de acuerdo con los trabajos de Shi y col., 2012 y Qi y col., 2017 [11, 12], con algunas modificaciones. Se crecieron las iPSC en medio de inducción neural N2/B27 suplementado con 10 µM de SB431542 (inhibidor de TGF-b), 1 µM de LDN 193138 (inhibidor de BMP), seguido por la exposición con 10 µM de inhibidor de Notch durante 96 h; posteriormente se realizó el cambio de medio por N2/B27 suplementado con los factores neurotróficos BDNF (Brain Derived Neurotrofic factor) y GDNF (Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor) a 30 ng/mL.

Identificación de marcadores neurales por inmunofluorescencia

Se realizó una Inmunofluorescencia para la identificación de marcadores de progenitores neurales y de neuronas. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min a TA y lavado 3 veces con PBS. Para la detección del marcador de progenitor neural se utilizó el anticuerpo primario nestina (R&D systems, 1:1000); para la detección de los marcadores neurales se utilizaron los anticuerpos primarios MAP2 (Abcam, 1:500) y TUJ1 (1:1000). Las células fueron permeabilizadas y bloqueadas simultáneamente con Triton-x100 al 0.1% en PBS1x con albúmina de suero bovino (BSA) al

1% durante 1h a TA. Se hicieron 3 lavados con PBS. Se incubaron los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa 488 anti ratón (1:1000) y Alexa 546 anti conejo (1:200), se incubaron 2h protegidos de la luz a TA. Se incubaron 10 min con Hoechst para teñir núcleos. Se foto documentaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71) y el programa QuickCapture.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad infectiva de los vectores lentivirales se comprobó mediante el uso del gen el reportero para la proteína verde fluorescente (GFP) con pLENTI-CMV-GFP-puro. Como se muestra en la Figura 1, se puede observar a las células infectadas con el vector lentiviral, por lo que se muestra la expresión positivas de GFP (Figura 1, B en color verde).

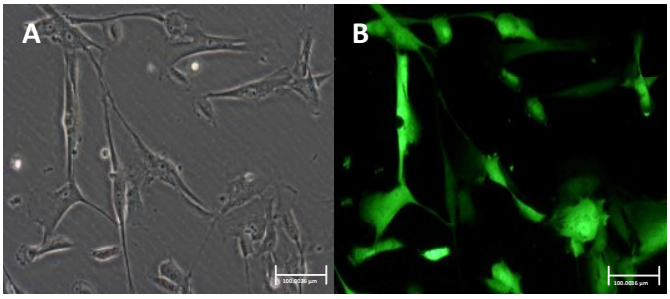


Figura 1. Prueba de infección con el reportero de fluorescencia GFP pLENTI-CMV-GFP-puro. A) Campo claro 10x. B) GFP (verde) 10x. Escala 100 µm. 48 h posteriores a la infección.

Establecimiento y caracterización de las líneas de iPSC

Durante el proceso de reprogramación lentiviral con 4 factores (OSKM), los fibroblastos pasaron por distintos estadios importantes de cambios morfológicos hasta llegar al estadio final de células troncales pluripotentes inducidas. En la figura 2, se muestra una representación gráfica de los días de mayor relevancia en cuanto a cambios morfológicos durante el proceso de reprogramación. Se observa como las células pierden su morfología fibroblastoide haciéndose de menor tamaño con núcleos prominentes. Producto de este proceso se aislaron 7 colonias de los fibroblastos con mutación y 4 colonias de los fibroblastos sin mutación, de las cuales lograron establecerse 4 y 3 líneas respectivamente. Estas líneas generadas a partir de fibroblastos con mutación fueron nombradas iFLAG 1, iFLAG 5, iFLAG 6 e iFLAG 7 (i: iPSC, F: Fibroblastos, L: Lentivirus, A: AG07768), y las generadas a partir de los fibroblastos sin mutación iFLN 1, iFLN 2, iFLN 3 e iFLN 4 (i: iPSC, F: Fibroblasto, L: Lentivirus, N: Normal) (Figura 3).

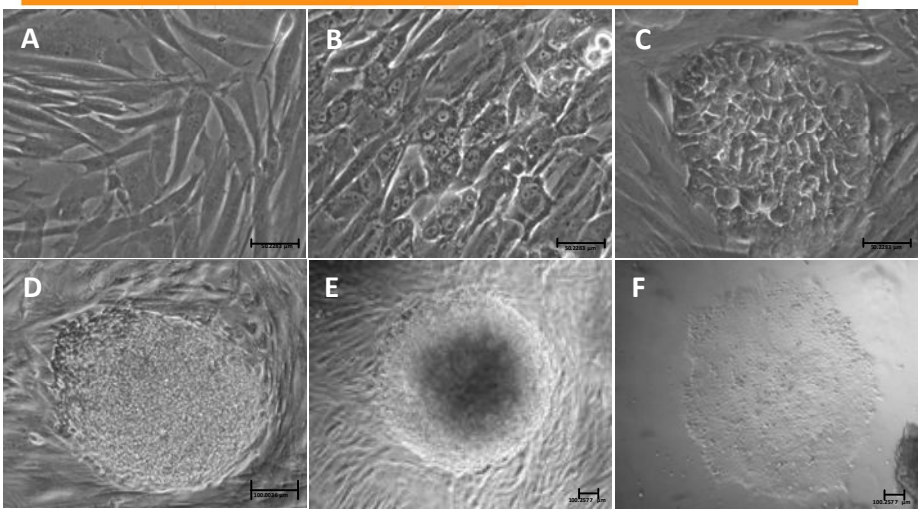


Figura 2. Proceso de reprogramación con lentivirus durante 25 días posteriores a la infección (A-F). A) Día 2. Cultivo de fibroblastos. B) Día 4. Inicia el cambio morfológico, pierden la morfología fibroblastoide, son más pequeñas y con núcleo prominente. C) Día 11. Se observa mayor compactación y tamaño de las colonias. D) Día 14. Hay mejoría en la definición de los bordes de las colonias, las colonias son compactas y más grandes. E) Día 20. Colonia con mayor definición de forma, son de mayor tamaño. Alta compactación al centro. F) Día 25. Colonia aislada. La colonia es plana y compacta. A-C) Aumento 20x. Escala 50 µm. D) Aumento 10x. E-F) Aumento 4x. Escala 100 µm.

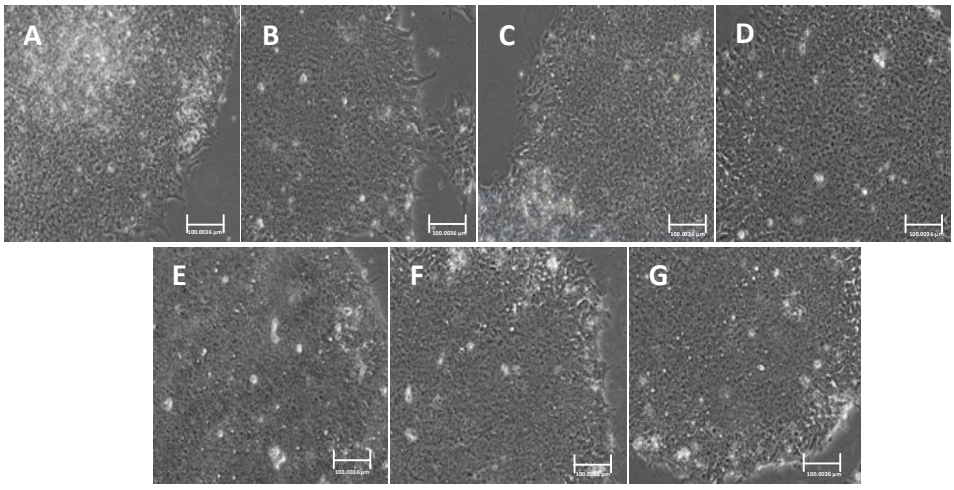


Figura 3. Líneas de iPSC obtenida del proceso de reprogramación lentiviral. A-D) Líneas iFLAG de células con la EA heredada, E-G) Líneas iFLN de células normales, A) iFLAG 1, B) iFLAG 5, C) iFLAG 6, D) iFLAG 7, E) iFLN 1, F) iFLN 2, G) iFLN 3. Son colonias planas y compactas, con bordes definidos, conformadas por células de citoplasma reducido y núcleo prominente. Aumento 10x, escala 100 µm. EA: Enfermedad de Alzheimer.

Actividad de la fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina se utiliza comúnmente como identificador de la pluripotencia en células troncales embrionarias (ESCs), células germinales embrionarias (EGCs) y en células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs), se trata de una enzima que se expresa en casi todos los tipos celulares, pero particularmente elevado en células troncales pluripotentes. Esta enzima se encarga principalmente de hidrolizar esteres de fosfato. Para detectar esta actividad en las iPSC se utilizó el sustrato cromogénico 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) en combinación con nitro blue tetrazolium (NBT), el BCIP es oxidado y se producen precipitados insolubles de diformazán en color azul oscuro. Los resultados de esta prueba muestran que las iPSC presentan una actividad evidente de la fosfatasa alcalina, en la Figura 4 se observa que las colonias positivas para esta actividad se encuentran teñidas en color negro.

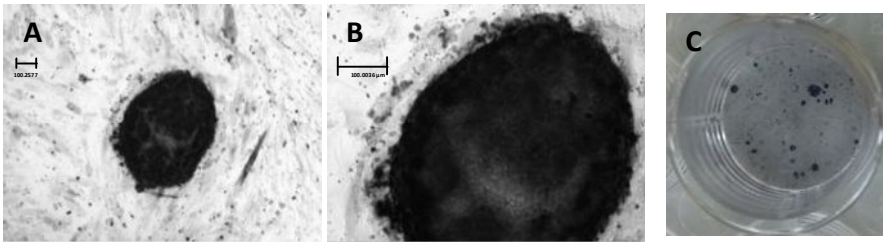


Figura 4. Identificación temprana de iPSC con la prueba de fosfatasa alcalina. Las colonias en color negro son positivas para la actividad de fosfatasa alcalina.

Silenciamiento de los transgenes

Esta prueba permitió identificar a las líneas que silenciaron a los transgenes. Este silenciamiento es ideal ya que significa que la pluripotencia de las líneas es propia y no por la continua expresión de los transgenes; lo que disminuye la posibilidad de problemas con la diferenciación, así como problemas relacionados con mutaciones. Para determinar lo anterior se llevó a cabo una RT-PCR de los transgenes pSIN4-EF2-O2S y pSIN4-CMV-K2M. En la figura 5, podemos observar el resultado de la prueba, en donde se utilizó el RNA de las líneas al pase 5. La única línea que silenció por completo ambos transgenes fue iFLAG 1, por lo que fue considerada como la mejor línea obtenida. Se aprecia una inhibición parcial de la expresión del transgen pSIN4-EF2-O2S en las líneas iFLAG 5, 6 y 7. Sin embargo, todas las líneas iFLAG silenciaron completamente el transgen pSIN4-CMV-K2M (Figura 5 A). En cuanto a las líneas iFLN, iFLN 1 y 2 no lograron silenciar ninguno de ambos transgenes. Sólo iFLN 3 silenció completamente K2M y parcialmente el O2S.

Las líneas derivadas de los fibroblastos con mutación silenciaron con mayor eficiencia los transgenes comparado con los fibroblastos sin mutación. Esto puede deberse a que las que tienen la mutación son menos transducibles comparadas con las que no tienen la mutación. Las líneas con silenciamiento parcial ya no se utilizaron en pruebas posteriores.

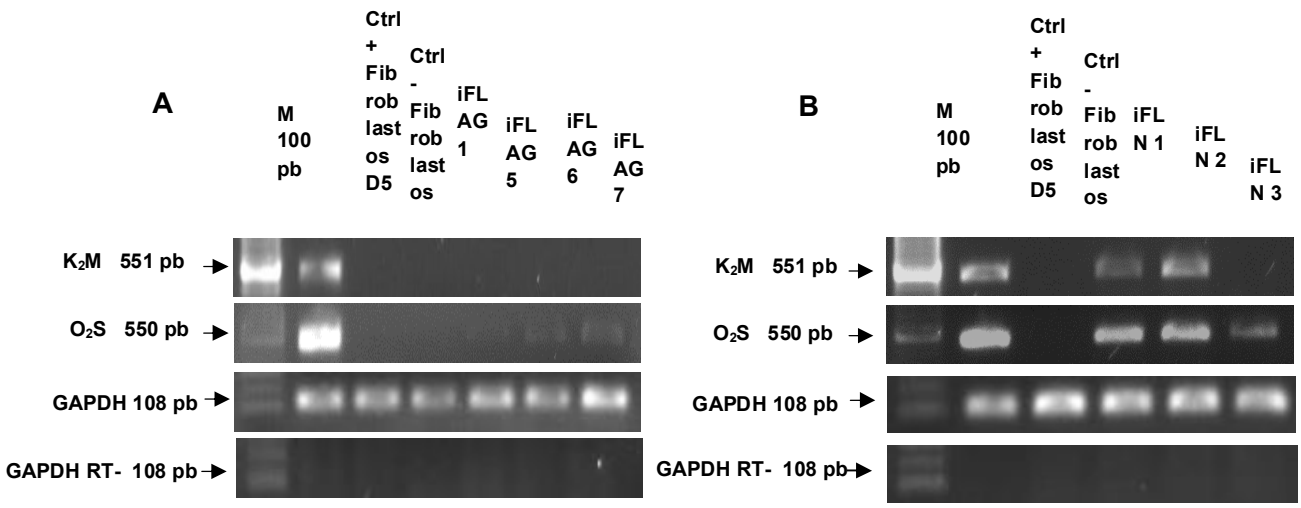


Figura 5. Resultado de la prueba de silenciamiento de los transgenes pSIN4-EF2-O2S y pSIN4-CMV-K2M por RT-PCR. Como control positivo (Ctrl +) se utilizaron fibroblastos de día 5 (D5) post-infección. Como control negativo (Ctrl-) se utilizaron fibroblastos no infectados. GAPDH fue utilizado como control constitutivo. GAPDH RT- fue el control de la reacción. Y el marcador (M) de 100 pb. A) iFLAG 1, iFLAG 5, iFLAG 6, iFLAG 7. Inhibición parcial de la expresión del transgen pSIN4-EF2-O2S en las líneas iFLAG 5, 6 y 7. En cuanto a la línea iFLAG 1 el silenciamiento fue completo. Con respecto al transgen pSIN4-CMV-K2M fue inhibida su expresión por completo en las 4 líneas. B) iFLN 1, iFLN 2 e iFLN 3. Las líneas iFLN 1 y 2 no lograron silenciar ambos transgenes. En cuanto a iFLN 3 silencio completamente el transgen K2M y parcialmente el O2S. La mejor línea obtenida fue iFLAG 1 debido a que silenció ambos transgenes.

Expresión de marcadores de pluripotencia

Para determinar la identidad pluripotente de las líneas obtenidas se realizó una inmunofluorescencia para detectar marcadores específicos de pluripotencia, utilizando los marcadores nucleares Nanog, OCT4 y SOX2, y los marcadores de superficie SSEA4 y TRA-1-60. A estos marcadores se les determina específicos debido a que son proteínas que se expresan en etapas tempranas del desarrollo, que son importantes para el mantenimiento de la pluripotencia. En la figura 6 se muestran imágenes representativas de las líneas en las que se muestra el marcaje positivo de los diferentes marcadores.

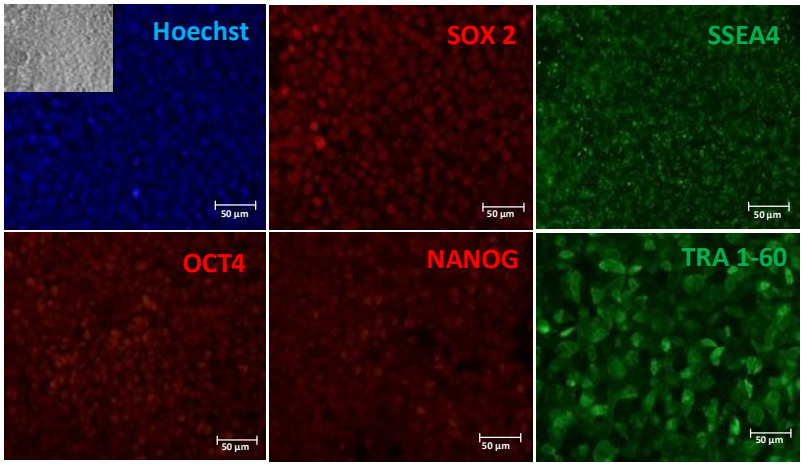


Figura 6. Expresión de marcadores de pluripotencia por inmunofluorescencia: OCT4, SOX2 y Nanog, marcadores nucleares mostrados en color rojo, SSEA4 y TRA 1-60 marcadores de superficie mostrados en verde. En azul los núcleos marcados con Hoechst. Aumento 20x, escala 50µm.

Expresión de genes endógenos de pluripotencia

Se realizó el análisis de la expresión de dos genes de pluripotencia: OCT4 y Nanog, por medio de una RT-PCR. Las líneas analizadas tuvieron expresión endógena de estos genes como se muestra en la figura 7. Como control positivo se utilizaron células troncales embrionarias (ESI), el control negativo consistió en fibroblastos, las líneas analizadas fueron iFLAG 1, iFLAG 5 e iFLN 3. Estos resultados nos indican que las líneas analizadas cuentan con la maquinaria propia de pluripotencia.

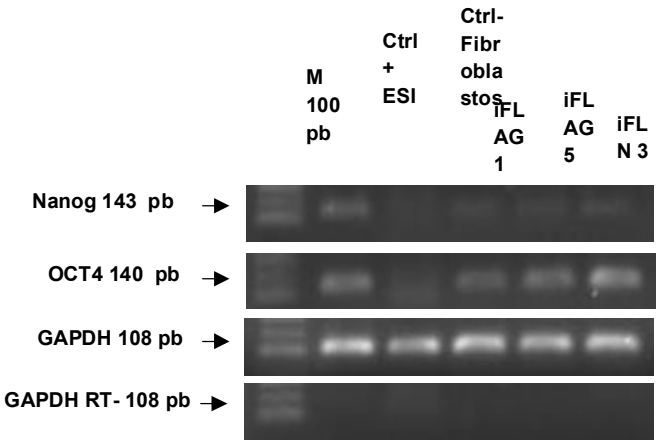


Figura 7. RT-PCR de genes endógenos. Expresión endógena de Nanog y OCT4 en las líneas iFLAG 1, iFLAG 5 e iFLN 3. GAPDH fue utilizado como control constitutivo. GAPDH RT-. Como control positivo se utilizó la línea celular ESI de células troncales embrionarias. Como control negativo se utilizaron fibroblastos

Diferenciación neural de las líneas de iPSC y expresión de marcadores específicos neurales

Las líneas de iPSC mostraron su capacidad de diferenciación hacia linaje neural, al expresar características particulares como el marcaje positivo para los marcadores Nestina, MAP2 y Tuj1. En la figura 8 se observa el seguimiento morfológico representativo del proceso de inducción neural de iPSC, en donde las células cambian su forma compacta con núcleo prominente hacia una forma alargada con más citoplasma y toman una disposición concéntrica. En la figura 9 se presentan los resultados representativos de la inmunodetección de marcadores neurales.

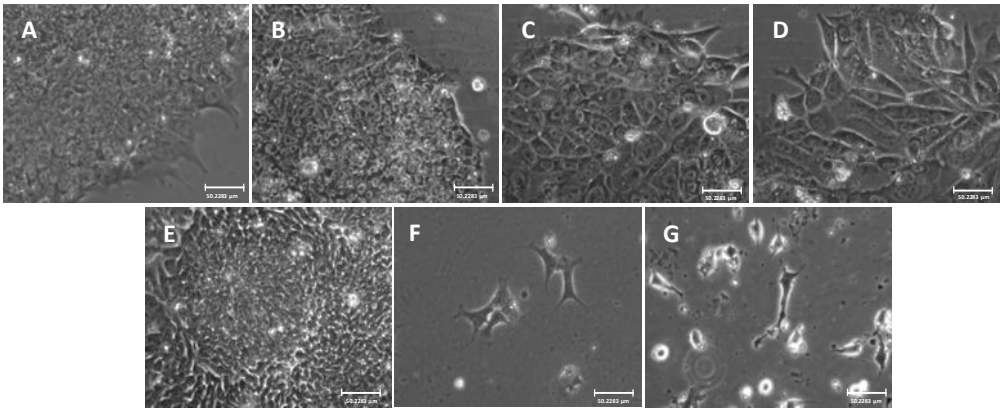


Figura 8. Inducción neural de iPSC. A) Día 0. Inicio de la inducción neural. B) Día 2 post-inducción. C) Día 3 post inducción. D) Día 4 post-inducción. E) Día 6 post-inducción. F) Día 11 post-inducción. G) 48h post-DAPT. Aumento 20x, escala 50µm.

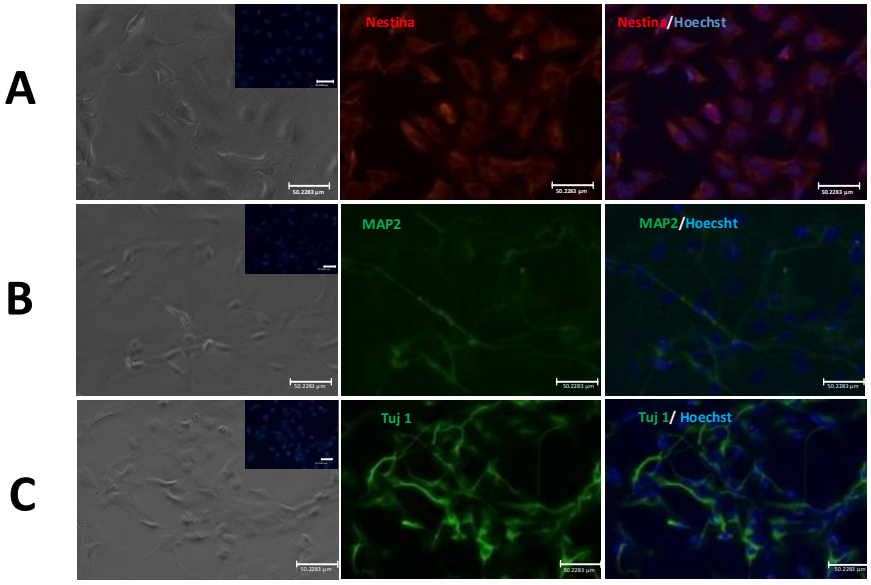


Figura 9. Inmunofluorescencia de marcadores de progenitoras nerurales y de neuronas. A) Para progenitores neurales el marcador Nestina en color rojo. B) Marcador neural MAP2 y C) Tuj 1 en color verde. Hoechst para núcleos en color azul. Aumento 20x, escala 50µm.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró la generación de iPSC a partir de fibroblastos de un paciente con la EA utilizando únicamente 4 factores de transcripción. Las iPSC obtenidas con este sistema mostraron características típicas de células troncales pluripotentes tal como ha sido descrito previamente en la literatura. Estas características incluyen: la expresión de proteínas asociadas a la pluripotencia y la capacidad de diferenciarse hacia tejidos de las 3 capas embrionarias; en este caso, la diferenciación hacia células neurales.

De esta manera, aquí se presenta el primer trabajo en México sobre la generación de líneas de células troncales pluripotentes inducidas de células procedentes de pacientes con la enfermedad de Alzheimer heredada. Este estudio da una pauta para que se continúe con esta línea de trabajo en el país, con pacientes nacionales, y contribuir con el desarrollo e implementación de modelos de la enfermedad para estudiar cuestiones de análisis de compuestos con potencial farmacológico. Nuestro siguiente paso inmediato es utilizar estas células en el modelado de la enfermedad de Alzheimer para su aplicación en un screening de compuestos con potencial farmacológico.

REFERENCIAS

[1] L. Robinson, E. Tang, and J.-P. Taylor, "Dementia: timely diagnosis and early intervention," *British Medical Journal,* vol. 350, 2015.

[2] J. I. Castrillo, and S. G. Oliver, "Alzheimer's as a Systems-Level Disease Involving the Interplay of Multiple Cellular Networks," *Systems Biology of Alzheimer's Disease*, 1303, pp. 3-48: Springer NY, 2016.

[3] K. Takahashi, and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell,* vol. 126, no. 4, pp. 663-76, 2006.

[4] T. Yagi, D. Ito, Y. Okada, W. Akamatsu, Y. Nihei, T. Yoshizaki, S. Yamanaka, H. Okano, and N. Suzuki, "Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells," *Hum Mol Genet,* vol. 20, no. 23, pp. 4530-9, 2011.

[5] M. A. Israel, S. H. Yuan, C. Bardy, S. M. Reyna, Y. Mu, C. Herrera, M. P. Hefferan, S. Van Gorp, K. L. Nazor, F. S. Boscolo, C. T. Carson, L. C. Laurent, M. Marsala, F. H. Gage, A. M. Remes, E. H. Koo, and L. S. Goldstein, "Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells," *Nature,* vol. 482, no. 7384, pp. 216-20, 2012.

[6] T. Kondo, M. Asai, K. Tsukita, Y. Kutoku, Y. Ohsawa, Y. Sunada, K. Imamura, N. Egawa, N. Yahata, K. Okita, K. Takahashi, I. Asaka, T. Aoi, A. Watanabe, K. Watanabe, C. Kadoya, R. Nakano, D. Watanabe, K. Maruyama, O. Hori, S. Hibino, T. Choshi, T. Nakahata, H. Hioki, T. Kaneko, M. Naitoh, K. Yoshikawa, S. Yamawaki, S. Suzuki, R. Hata, S. Ueno, T. Seki, K. Kobayashi, T. Toda, K. Murakami, K. Irie, W. L. Klein, H. Mori, T. Asada, R. Takahashi, N. Iwata, S. Yamanaka, and H. Inoue, "Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness," *Cell Stem Cell,* vol. 12, no. 4, pp. 487-96, 2013.

[7] S. H. Choi, Y. H. Kim, M. Hebisch, C. Sliwinski, S. Lee, C. D/'Avanzo, H. Chen, B. Hooli, C. Asselin, J. Muffat, J. B. Klee, C. Zhang, B. J. Wainger, M. Peitz, D. M. Kovacs, C. J. Woolf, S. L. Wagner, R. E. Tanzi, and D. Y. Kim, "A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer/'s disease," *Nature,* vol. 515, no. 7526, pp. 274-278, 11/13/print, 2014.

[8] L. Mohamet, N. J. Miazga, and C. M. Ward, "Familial Alzheimer's disease modelling using induced pluripotent stem cell technology," *World Journal of Stem Cells,* vol. 6, no. 2, pp. 239-247, 2014.

[9] K. Freude, C. Pires, P. Hyttel, and V. J. Hall, "Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Alzheimer's Disease Patients: The Promise, the Hope and the Path Ahead," *J Clin Med,* vol. 3, pp. 1402-36, 2014.

[10] P. F. Palma V., Rehen S., Touriño C., Velasco I., "Stem cell research in Latin America: update, challenges and opportunities in a priority research area," *Regenerative Medicine,* vol. 10, no. 6, pp. 785-798, 2015.

[11] Y. Shi, P. Kirwan, and F. J. Livesey, "Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks," *Nat Protoc,* vol. 7, no. 10, pp. 1836-46, 2012.

[12] Y. Qi, X.-J. Zhang, N. Renier, Z. Wu, T. Atkin, Z. Sun, M. Z. Ozair, J. Tchieu, B. Zimmer, F. Fattahi, Y. Ganat, R. Azevedo, N. Zeltner, A. H. Brivanlou, M. Karayiorgou, J. Gogos, M. Tomishima, M. Tessier-Lavigne, S.-H. Shi, and L. Studer, "Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells," *Nat Biotech,* vol. 35, no. 2, pp. 154-163, 2017.

VIRUS ONCOLÍTICO Y SU POTENCIAL TERAPÉUTICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA.

[1]Gutiérrez-Ortega, R.C., [1]Sánchez-Soto, J.E., [2]Gaona-Bernal, J., [1]Cárdenas-Vargas, A., [3]Absalón-Constantino, A.E., y [1]*Herrera-Rodríguez, S.E.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Av. Normalistas #800 Colinas de la Normal C.P. 44270.
2. Departamento de Microbiología y Patología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, Puerta 7, Edificio A, Col. Independencia, C.P. 44340.
3. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, unidad Tlaxcala, Biología Molecular, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700.

*Autor para correspondencia: sherrera@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es el tumor maligno más común en población masculina a nivel mundial. En México, el CaP ocupa el cuarto lugar seguido del cáncer de pulmón, hígado y estómago, sin embargo, su incidencia es el número uno en mortalidad y prevalencia. El daño de esta patología está influenciado por los tratamientos usualmente utilizados, los cuales siguen siendo invasivos y con efectos adversos. En los últimos años, la investigación en los tratamientos para combatir el cáncer se ha enfocado en hacerlos más específicos, efectivos y con menores efectos adversos. Es aquí donde la viroterapia puede ser una alterativa alentadora, puesto que tiene como característica la especificidad de la célula tumoral de forma natural. Este trabajo propone el uso del virus de la enfermedad de Newcastle (*NDV*) como tratamiento oncolítico para el CaP, debido a que su infección y replicación es selectiva a las células tumorales, además de induce la muerte celular a través de procesos que involucran la replicación viral y la activación del sistema inmune. Por otra parte, se pretende silenciar proteínas como Bmi-1 que están involucradas con el desarrollo de dicha patología.

Palabras clave: Cáncer de próstata; Virus oncolítico; Virus de la Enfermedad de Newcastle.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) ocupa el segundo lugar de padecimientos a nivel mundial en hombres y se diagnostican alrededor de 1.1 millones de casos por año. En el 2012 se estimaron 307,000 muertes causadas por el CaP, siendo así la quinta causa de muerte por cáncer en la población. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, refiere que en el 2012 se diagnosticaron aproximadamente 14,000 casos nuevos de CaP en México, de las que se reportaron alrededor de 6,000 muertes causadas por dicha patología. En México, el CaP es la primera causa en incidencias y causa de muerte con respecto al cáncer [1].

Los tratamientos enfocados en la erradicación del tumor, basados en la quimioterapia, terapia hormonal y la radioterapia son solo temporalmente útiles, al no ser específicos en la progresión de CaP e

invariablemente existe progresión y metástasis a varios órganos como los nódulos linfáticos locales y principalmente a tejido esquelético, causando en consecuencia el desarrollo de CaP letal, afectando significativamente las tasas de supervivencia de los hombres con estadios de CaP avanzado [2][3].

Viroterapia, una nueva alternativa.

Los virus que se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer se denominan virus oncolíticos. Estos virus infectan selectivamente las células cancerosas e inducen la muerte celular a través de varios procesos que involucran la replicación viral y la activación del sistema inmune anti-cáncer. Estos virus pueden tener de forma natural actividad oncolítica o se puede modificar a los virus para otorgarle características oncolíticas además de favorecer su capacidad de destrucción de células cancerosas, a través de los mecanismos de la lisis celular directa, apoptosis, autofagia y toxicidad celular[4] esto sin afectar el tejido sano, lo que reduce a los efectos secundarios de las terapias actuales.

Este trabajo se centra en el *virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)* como viroterapia oncolítica para el CaP. Su infección y replicación es selectiva a las células tumorales, además induce la muerte celular a través de procesos que involucran la replicación viral y la activación del sistema inmune [5].

La terapia con virus oncolíticos (VO), ya sea desarrollados por ingeniería genética o de origen natural, es quizá el próximo gran avance en el tratamiento contra el cáncer [6], desafortunadamente, existen pocos estudios para tratar en particular el CaP, menos aún, estudios donde la viroterapia sea una herramienta aunada a otros tratamientos donde se inhiba la sobreexpresión de proteínas que participan en la progresión del cáncer. Dentro de las proteínas que se sobreexpresan en el CaP, tanto en el de alto como de bajo grado, se encuentra el oncogén Bmi-1 el cual está de manera sobre-expresada en el CaP desempeñando un papel crucial en la proliferación celular, la transformación, la transición epitelial-mesenquimal (EMT), la auto-renovación de las células madre, la iniciación del cáncer y quimio-resistencia en diversos tumores humanos [7].

La finalidad es proponer una terapia donde además de hacer uso de las propiedades de *NDV*, también permita identificar la sobreexpresión de Bmi-1 en las líneas celulares que mimetizan a este cáncer (LnCaP, DU-145 y PC-3), para posteriormente silenciar su expresión haciendo uso de los siRNAs (small interfering RNA, o RNA de silenciamiento*)* RNAs pequeños de doble cadena que bloquean la expresión de un gen a nivel postranscripcional al inducir la degradación de su RNAm) [8] para proseguir con el análisis del efectos sinérgico esperado de ambas metodologías por medio de ensayos de citotoxicidad en las líneas celulares y midiendo la viabilidad celular por medio de la prueba de MTT y tinción de DAPI para detectar células apoptóticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y condiciones de cultivo

Línea celular PC-3. Es una línea celular proveniente de tejido derivado de la próstata de humano, adenocarcinoma grado IV de un paciente masculino caucásico de 62 años de edad. Entre las propiedades de crecimiento se menciona que son células adherentes, de crecimiento rápido[9]. La propagación de las células se realizó empleando el medio de cultivo F-12K (Kaighn's Modification of Ham`s, ATCC) suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37°C en una incubadora con atmósfera húmeda y CO2 al 5%. Las células se cultivaron hasta obtener una confluencia del 80% y sub-cultivadas cada tercer día antes de los experimentos.

Línea celular DU-145. Es una línea celular proveniente de tejido derivado de la próstata de humano, carcinoma de un paciente masculino caucásico de 69 años de edad. Entre las propiedades de crecimiento se menciona que son células adherentes, de crecimiento rápido [10]. Para su expansión se trabajó con medio EMEN (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC) suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37°C en una incubadora con atmósfera húmeda y CO2 al 5%. Las células se cultivaron hasta obtener una confluencia del 80% y sub-cultivadas cada tercer día antes de los experimentos.

Línea celular LNCaP. Es una línea celular proveniente de tejido derivado de la próstata de humano (ganglio linfático supraclavicular izquierdo), carcinoma metastásico de un paciente masculino caucásico de 50 años de edad [11]. Se empleó para su expansión el medio de cultivo RPMI-1640 de ATCC, suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37°C en una incubadora con atmósfera húmeda y CO2 al 5%. Las células se cultivaron hasta obtener una confluencia del 80% y sub-cultivadas cada tercer día antes de los experimentos.

Línea celular VERO. Es una línea celular proveniente de tejido de riñón de *Cercopithecus aethiops,* un mono africano de edad adulta [12]. Esta línea celular fue útil para la expansión viral. Para su expansión se utilizó el medio de cultivo DMEN (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose; Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37°C en una incubadora con atmósfera húmeda y CO2 al 5%. Las células se cultivaron hasta obtener una confluencia del 80% y sub-cultivadas cada tercer día antes de los experimentos.
Para complementar los resultados esperados se trabajó además con las líneas celulares SK-BR-3 (tejido derivado de la glándula mamária de humano con adenocarcinoma), HeLa (tejido derivado del cérvix de humano, con adenocarcinoma) y HT-29 (tejido derivado del colon de humano con adenocarcinoma). Las células se cultivaron hasta obtener una confluencia del 80% y sub-cultivadas cada tercer día antes de los experimentos.

Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-MLS)
NDV-MLS es un virus atenuado de forma natural (no recombinante) derivada de la cepa LaSota crecido en huevos de pollo embrionados libres de patógenos (ALPES, Puebla, México). La replicación viral se llevó a cabo por la inoculación del virus a las células Vero en frascos T-25 con una confluencia del 80%. Dado a que no se conocía la concentración del virus, el cual se encontraba almacenado en un crio-vial a -80° C, se inoculó utilizando 2 volúmenes diferentes (250 y 500µl). Las células infectadas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO 2 durante 5 días. Al quinto día se cosechó el virus tomando el sobrenadante de las células infectas y se almacenó a -80° C para posteriores ensayos.

Diseño de los siRNA
Se realizó la búsqueda de la secuencia de la proteína Bmi-1 en NCBI e identificación del marco de lectura abierto con la herramienta Translate en ExPaSy. Además, los siRNAs fueron diseñados por la casa comercial *ThermoFisher Scientific* [13][14]. Se tomó un siRNA de referencia a partir de un artículo ya reportado [15]. Aunado a los 2 siRNAs diseñados, al ya reportado y al control negativo, se optó por comprar un siRNA ya prediseñado por la misma casa comercial *ThermoFisher Scientific* [16].
Mediante el uso del servicio BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, USA) se verificó el sitio de complementariedad entre el ARN mensajero de la proteína y los siRNAs.

Lisis Proteica de todas las líneas celulares

Después de retirarles el medio a las células se le añadió 5 ml de PBS 1X frío para lavar las células, se agitó suavemente el frasco con movimientos rotatorios y se desechó. Este procedimiento se realizó una vez más. Desechado el PBS, se añadió al frasco T-75 de las células correspondientes 7 ml de PBS 1X frío y con un Scrapper (marca Nunc) se despegaron las células. Se tomó todo el volumen y se colocó en tubos falcón de 15 ml. Los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µl del detergente RIPA al botón de células. Se le dio vortex al botón para resuspender y se sonicó por 15 segundos en 3 ocasiones. Los lisados proteicos se almacenaron a -80 °C.

Extracción de RNA total de todas las líneas celulares

Después de retírales el medio a las líneas celulares se les añadió 5 ml de PBS 1X para lavar las células, se agitó suavemente los frascos con movimientos rotatorios, se retiró el PBS y se agregó 1ml de Tripsina 0.05%/EDTA 0.54Mm 1X (Corning*),* se incubó por 5 minutos a 37 °C 5% CO2. Después se añadió 1 ml del medio correspondiente a la línea celular para la inactivación de la Tripsina para proseguir con la recuperación del sobrenadante. Las células son centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y se añade 1 ml de TRIzol (ambion). Se re suspende el medio y se almacena a -80°C.

Western Blot

Se realizó Western Blot para identificar la proteína Bmi-1 en todas las líneas celulares de cáncer a partir de los lisados proteicos. Dado que el reactivo para la cuantificación no fue exitoso puesto que el detergente utilizado para el lisado intervenía con la lectura de la cuantificación de proteínas, se ajustaron los volúmenes de cada muestra para obtener un rango de concentración similar en cada muestra. Las proteínas totales se desnaturalizaron con 5% de 2-mercaptoetanol por 5 minutos a 95°C y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SPS-PAGE). El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante 7 min a 150V más 90 minutos a 120V a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, en cámara de transferencia húmeda. Se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente se lavó la membrana para su incubación con el anticuerpo primario anti-Bmi-1 en una dilución 1:1,000 con agitación suave durante toda la noche a 4°C. Pasado el tiempo, se realizaron 3 lavados durante 5 minutos, cada lavado con 10 ml de TBST. Lavada la membrana, se incubo el anticuerpo secundario IgG anti-conejo unido HRP en 10 ml de solución tampón bloqueadora con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguido se lavó la membrana por 3 ocasiones durante 5 minutos cada lavado. Para revelar las bandas se utilizó el Kit de Bio-Rad *HRP Conjugate Substrate.*

RESULTADOS

Amplificación de las Líneas Celulares

Todas las líneas celulares se descongelaron en frascos T-25 con sus medios correspondientes, una vez alcanzado la confluencia del 80%. Las células se pasaron a frascos T-75 para su expansión. Las amplificaciones de todas las líneas celulares se utilizaron para la extracción de proteínas totales, extracción de RNA y para los ensayos virales. (Fig. 1)

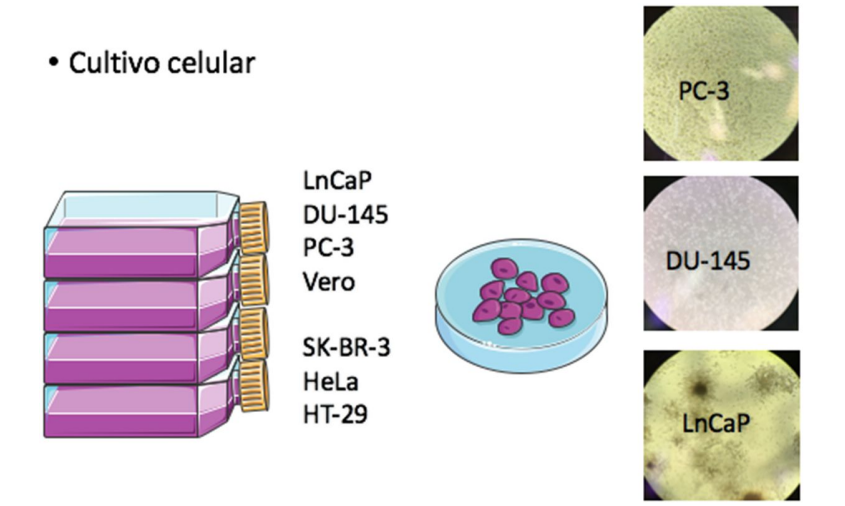


Figura 1 Líneas celulares. Las fotos fueron tomas con el objetivo 4X después de las 72 horas de haberse realizado el pasaje a los frascos T-75.

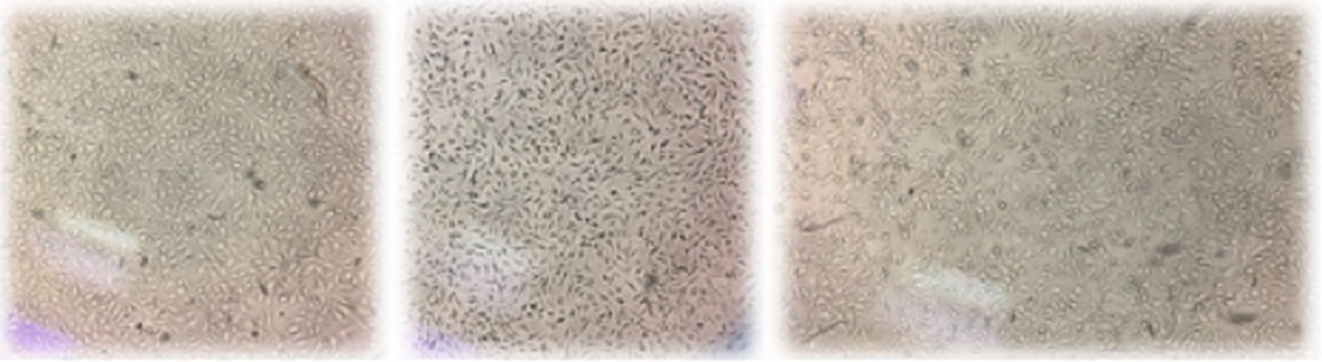
Infecciones virales con NDV-MLS

Para las infecciones virales con *NDV-MLS* se prepararon 3 frascos T-25 con una confluencia del 70% de células Vero utilizando medio DMEM/5% SFB. Una vez que las células se encontraban a esta confluencia se procedió a realizar la infección con *NDV*.

- Para esto, se desechó el medio DMEM/5% SFB y se agregó 2 ml de únicamente medio DMEM.
- Posteriormente se pasó a infectar las células con *NDV*, añadiendo 500 µl a un frasco (etiquetándolo como 1), 250 µl a otro frasco (etiquetándolo como 1/2) y el tercer frasco se utilizó como control al cual no se infectó.
- El restante del virus que quedó en el vial se inactivó dejándolo bajo los rayos UV durante 15 minutos y después se almaceno a -80 grados centígrados. Este virus inactivado se utilizará para ensayos posteriores como control negativo.
- Después de las infecciones, los frascos se agitaron suavemente para dispersar el virus y se incubaron a 37°C/5% CO2. Cada 20 minutos los frascos se meneaban suavemente durante 2 horas.
- Pasado las 2 horas (tiempo suficiente para la infección viral), el medio se retiró y se desechó, después se agregó 4 ml de medio DMEM/2% SFB (porcentaje de SFB para enlentecer la división celular) y se incubaron a 37°C/5% CO2 durante 6 días.
- Se llevó un registro del proceso vírico durante estos días (Fig. 2).

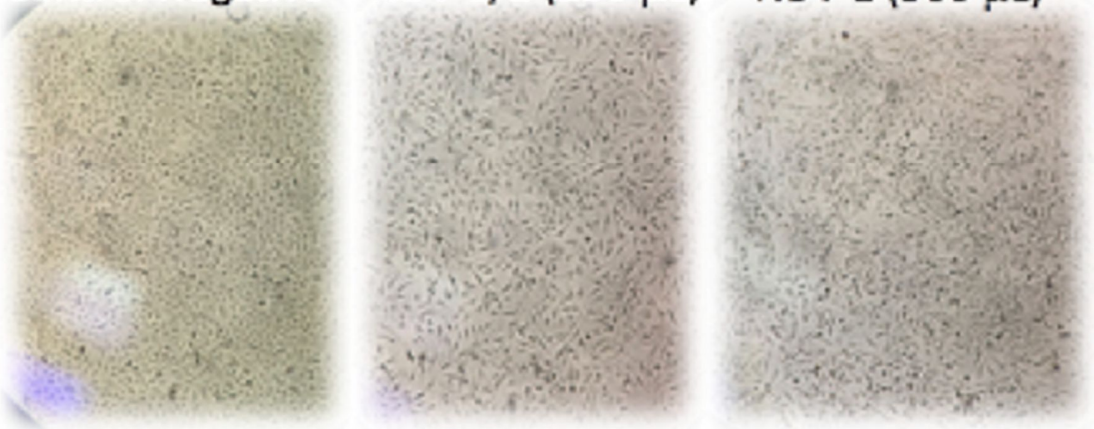
24 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

Control Negativo | NDV 1/2 (250 µL) | NDV 1 (500 µL)



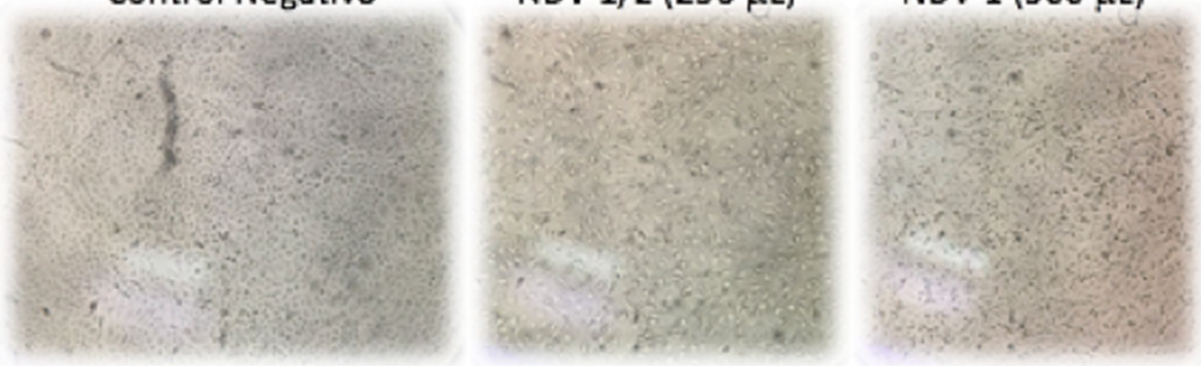
48 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

Control Negativo | NDV 1/2 (250 µL) | NDV 1 (500 µL)



72 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

Control Negativo | NDV 1/2 (250 µL) | NDV 1 (500 µL)



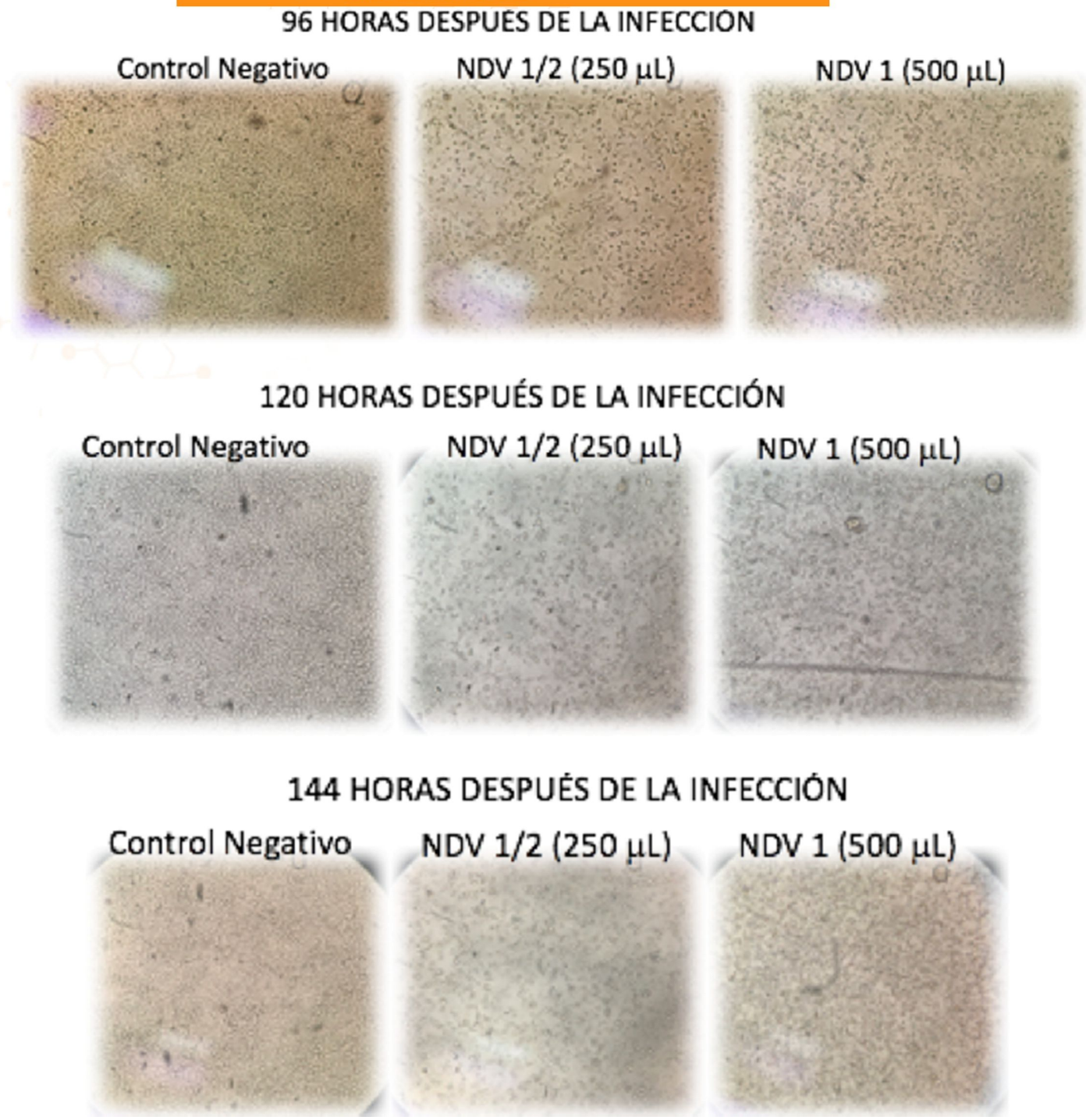


Figura 2 Infección Viral con *NDV-MLS*. Las fotos fueron tomas con el objetivo 4X después de cada 24 horas durante 6 días.

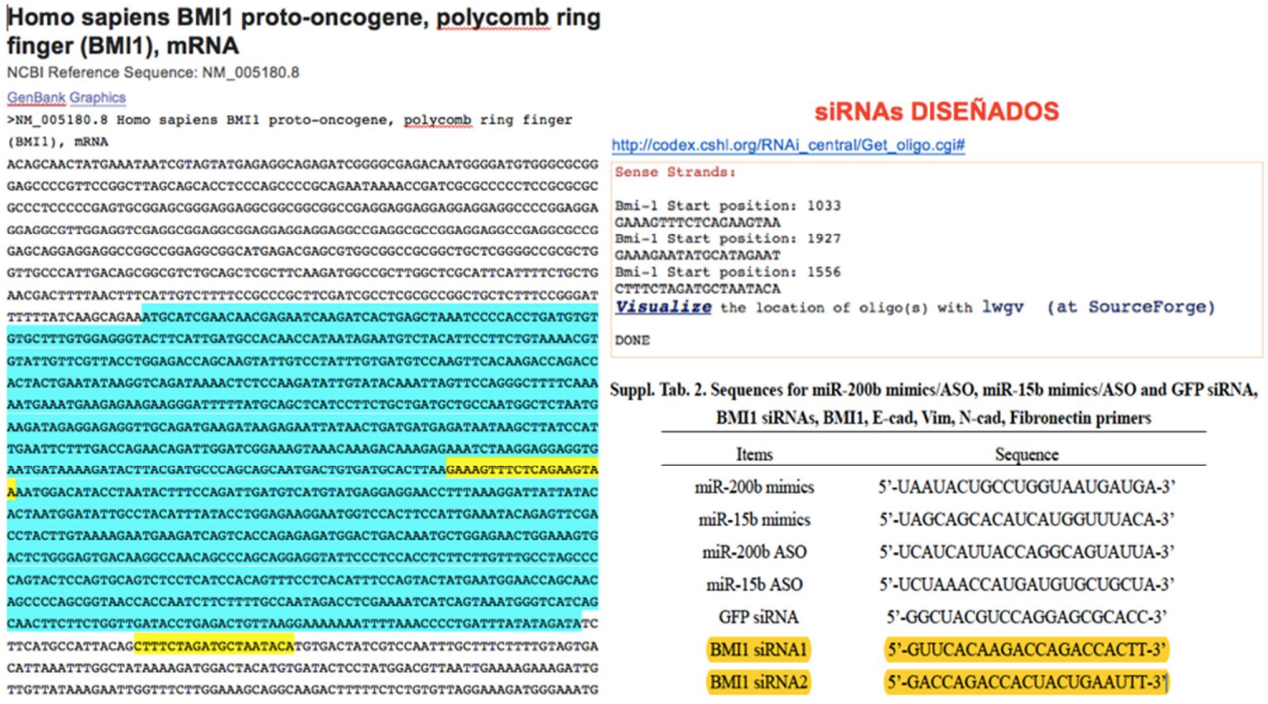
A través de los días se logra percibir como el virus está afectando a las células en comparación de las que no se encuentran infectadas. También se observa que la infección con mayor volumen de *NDV-MLS* (500µl) perjudicó en un tiempo menor y más agresivo al cultivo celular. En el sexto día después de la infección, se procedió a recuperar el sobrenadante de los frascos (para esto se pipeteo el frasco con el mismo medio para tratar de despegar las células que posiblemente aún estaban adheridas) este procedimiento únicamente se realizó en los frascos que se infectaron.

- Se recuperó 3 ml de cada frasco.
- Posteriormente se centrifugaron los tubos falcón a 2,000 rpm por 5 minutos, con la finalidad de precipitar las células y dejar en el sobrenadante a los virus.
- Una vez centrifugado se almacenó el sobrenadante en 3 crio viales con 1 ml de sobrenadante cada uno a -80°C.

Diseño de los siRNAs

Como se mencionó en la metodología, se obtuvo el diseño de 2 siRNAs y un control negativo a partir de la plataforma que proporciona la casa comercial *ThermoFISHER,* además de que se eligió un siRNA ya reportado, esto aunado al siRNA que la misma casa comercial vende ya diseñado (Fig. 3).

Cabe mencionar que aún no se han realizado experimentos con los siRNAs puesto que todavía no se cuentan con ellos.



Suppl. Tab. 2. Sequences for miR-200b mimics/ASO, miR-15b mimics/ASO and GFP siRNA, BMI1 siRNAs, BMI1, E-cad, Vim, N-cad, Fibronectin primers

Items	Sequence
miR-200b mimics	5'-UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA-3'
miR-15b mimics	5'-UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA-3'
miR-200b ASO	5'-UCAUCAUUACCAGGCAGUAUUA-3'
miR-15b ASO	5'-UCUAAACCAUGAUGUGCUGCUA-3'
GFP siRNA	5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCACC-3'
BMI1 siRNA1	5'-GUUCACAAGACCAGACCACTT-3'
BMI1 siRNA2	5'-GACCAGACCACUACUGAAUTT-3'

Figura 3 siRNA. A partir del ARN mensajero de la proteína de interés a silenciar, fue como se diseñaron y eligieron los siRNAs.

DISCUSIÓN

La diversidad y la heterogeneidad genética de las células de cáncer continuará siendo el reto más importante para el desarrollo de terapias eficaces contra dicha patología. El tratamiento ideal se basaría en la erradicación y eliminación de las células malignas dejando intactos los tejidos normales. Los avances en la manipulación genética, que investigan el desarrollo de vectores virales dirigidos selectivamente a destruir las células tumorales, han generado expectativas para aquellos pacientes que se encuentran en situaciones en las que el cáncer resulta incurable, como es el caso de los pacientes con cáncer de próstata refractario a hormonas (causante de la progresión a metástasis y cáncer en huesos), por lo tanto, nuevos enfoques terapéuticos son claramente necesarios. Durante las últimas décadas la viroterapia ha sido evaluada ampliamente en ensayos clínicos y preclínicos contra el cáncer, esto gracias a las propiedades de los virus oncolíticos que les permiten replicarse, difundirse y destruir a las células tumorales sin dañar el tejido sano. Estos virus pueden matar a las células cancerosas a través de diversos mecanismos que incluyen la apoptosis, la autofagia, lisis directa, necrosis y la estimulación de la respuesta inmune. Ejemplo de estos virus oncolíticos es el *NDV*, virus que ha sido utilizado como agente oncolítico el cual ha revelado resultados positivos como tratamiento contra el cáncer. Krishnamurthy y colaboradores demostraron que *NDV* se replicaba eficientemente en 4 diferentes tumores (adenocarcinoma de próstata, carcinoma cervical, adenocarcinoma colorrectal y carcinoma adenoescamoso de pulmón) induciendo la lisis y muerte celular [17]. Por lo tanto, fue entonces que se decidió hacer evaluaciones en líneas celulares que representan al CaP, dado que estas sobreexpresan glicoproteínas que contienen residuos de ácido siálico el cual sirve como receptores para *NDV*, garantizando una interacción preferencial con las células tumorales y poder así confirmar la selectividad de este virus. Por otra parte, Elankumaran y colaboradores evaluaron y comprobaron que un virus recombinante maximizaba los efectos oncolíticos contra las células tumorales de fibrosarcoma [18], por lo que se pretende en primera instancia, hacer una comparativa entre *NDV* pos sí solo y *NDV* que a la par, intervengan siRNAs que favorezcan la supresión de proteínas oncogénicas involucradas con la progresión del cáncer en las líneas celulares. De ser favorable los resultados, pensar en la posibilidad de generar un virus recombinante con siRNAs. Cabe mencionar, que fue de suma importancia tomar en cuenta los parámetros para el diseño de los RNAs de silenciamiento, dado que estos tendrán la capacidad de interaccionar con el RNA mensajero de Bmi-1, activando al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) para posteriormente su degradación, lo que conlleva la supresión de esta proteína.

Este proyecto actualmente se encuentra en pleno desarrollo, como se mostró en los resultados preliminares, ya se amplificó el virus en las células Vero observándose un efecto citolítico exitoso, además, ya se cuenta con las células tumorales que mimetizarán el desarrollo del CaP. Por otra parte, la amplificación de estas mismas células será útil para proseguir en cuanto se tengan los siRNAs con los ensayos de silenciamiento de genes, en este caso el oncogén Bmi-1.

CONCLUSIÓN

- Se obtuvo la semilla de cada una de las líneas celulares para realizar los ensayos de infección y el silenciamiento de Bmi-1.
- Se obtuvo el lisado de proteínas totales de cada una de las líneas celulares para hacer la identificación de la proteína Bmi-1 por medio de Western Blot.
- Se obtuvo el ARN total de todas las líneas celulares para posteriormente continuar con la obtención del ARN mensajero de Bmi-1, esto antes y después de su silenciamiento por medio de la PCR en tiempo real.

- Se diseñaron los siRNAs tomando en cuenta los logaritmos recomendados para la generación de siRNAs eficaces.
- Se infectó y propago el virus *NDV-MLS* en las células Vero, observándose un efecto citolítico. Posteriormente se procederá a infectar las líneas celulares del CaP, así como también, la línea celular del tejido sano de próstata.

REFERENCIAS

[1] "GLOBOCAN 2012." [Online]. Available: http://globocan.iarc.fr/old/bar_site.asp?selection=24191&title=Prostate&sex=1&statistic=2&populations=6&window=1&grid=1&orientation=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit = Execute . [Accessed: 13-Feb-2017].

[2] F. K. Engels and J. Verweij, "Docetaxel administration schedule: From fever to tears? A review of randomised studies," *Eur. J. Cancer*, vol. 41, no. 8, pp. 1117–1126, 2005.

[3] B. J. Feldman and D. Feldman, "The development of androgen-independent prostate cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 34–45, 2001.

[4] H. H. Wong, N. R. Lemoine, and Y. Wang, "Oncolytic viruses for cancer therapy: Overcoming the obstacles," *Viruses*, vol. 2, no. 1, pp. 78–106, 2010.

[5] H. Y. Lam *et al.*, "Safety and clinical usage of newcastle disease virus in cancer therapy," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, 2011.

[6] H. Fukuhara, Y. Ino, and T. Todo, "Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn," *Cancer Science*, vol. 107, no. 10. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1373–1379, 01-Oct-2016.

[7] R. U. Lukacs, S. Memarzadeh, H. Wu, and O. N. Witte, "Bmi-1 Is a Crucial Regulator of Prostate Stem Cell Self-Renewal and Malignant Transformation," *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 682–693, Dec. 2010.

[8] P. Corbeau, "Interfering RNA and HIV: Reciprocal Interferences," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 9, p. e1000162, Sep. 2008.

[9] "PC-3 ATCC ® CRL-1435™ Homo sapiens prostate; derived from me." [Online]. Available: https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx#generalinformation. [Accessed: 20-Sep-2017].

[10] "DU 145 ATCC ® HTB-81™ Homo sapiens prostate; derived from me." [Online]. Available: https://www.atcc.org/Products/All/HTB-81.aspx#generalinformation. [Accessed: 20-Sep-2017].

[11] "LNCaP clone FGC ATCC ® CRL-1740™ Homo sapiens prostate; deri." [Online]. Available: https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1740.aspx#generalinformation. [Accessed: 20-Sep-2017].

[12] "Vero ATCC ® CCL-81™ Cercopithecus aethiops kidney normal." [Online]. Available: https://www.atcc.org/Products/All/CCL-81.aspx#generalinformation. [Accessed: 20-Sep-2017].

[13] "ARNip."

[14] S. M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate," *EMBO J.*, vol. 20, no. 23, pp. 6877–6888, Dec. 2001.

[15] L. Sun *et al.*, "MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1," *Oncogene*, vol. 31, no. 4, pp. 432–445, Jan. 2012.

[16] "s2016 siRNAs." [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/sirna/keyword/s2016?SID=srch-uc-sirna-s2016&mode=and. [Accessed: 20-Sep-2017].

[17] S. Krishnamurthy, T. Takimoto, R. A. Scroggs, and A. Portner, "Differentially regulated interferon

response determines the outcome of Newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines.," *J. Virol.*, vol. 80, no. 11, pp. 5145–55, Jun. 2006.

[18] S. Elankumaran *et al.*, "Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy.," *J. Virol.*, vol. 84, no. 8, pp. 3835–44, Apr. 2010.

EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD DEL CIGARRO ELECTRÓNICO MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS Y OTRAS ANORMALIDADES NUCLEARES EN MUCOSA BUCAL.

[1]Arias-Ruiz, L.F., [1]Landa-Saldaña, A., [1]Montes-Güitrón, J.A., [1]Brito-Torres, A.E., [2]Armijo-Gómez, J.A., [1]Molina-Noyola, L.D., [3]Zavala-Cerna, M. G., [3*]Torres-Bugarín, O.

1. Universidad Autónoma de Guadalajara, Facultad de Medicina, Av. Montevideo 3035, Lomas del Valle 3a. Sección, Guadalajara, México 44670
2. Benemérito Hospital General con Especialidades Juan María de Salvatierra, Departamento de pediatría, Av. Paseo de Los Deportistas de Octubre 2da Secc, La Paz, México 23085.
3. Universidad Autónoma de Guadalajara, Programa Internacional de Medicina, Av. Montevideo 3035, Lomas del Valle 3a. Sección, Jalisco, México 44670.

Autor para correspondencia: oliviatorres@hotmail.com

Área del conocimiento: Quimicofarmacobiológica

RESUMEN

Introducción: El cigarro electrónico (*e-cig*) está diseñado para sustituir el tabaquismo; pero estudios que demuestren los daños que provoca su uso, son escasos. Un posible efecto es la genotoxicidad, evidente con el uso del tabaco. La genotoxicidad produce síntomas a largo plazo de manera irreversible y se asocia con estados patológicos. Metodología: Se realizó un estudio transversal descriptivo en el que se incluyeron 50 individuos usuarios de cigarro electrónico y 50 controles sanos de la población general; se les tomó una muestra de mucosa bucal y en ella, se identificó la frecuencia de células micronucleadas (CMN), y la presencia de otras anormalidades nucleares. Para el análisis estadístico se utilizó Kruskal-Wallis y Kolmogorov-Smirnov. Resultados: La edad entre ambos grupos fue similar. En los fumadores la frecuencia de CMN representan daño en el DNA fue más baja, sin embargo, la frecuencia de células binucleadas (CBN) (alteraciones en la mitosis), la cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR) y cariolisis (CL) reflejan muerte celular; fue mayor que en el grupo control; el aumento de estas dos últimas impide observar CMN por ello son inferiores al control. Conclusión: El uso del *e-cig* induce formación de CBN, CC y CR, que representan citotoxicidad en epitelio de mucosa.

Palabras clave: Micronúcleos; anormalidades nucleares; genotoxicidad; cigarro electrónico; mucosa bucal.

INTRODUCCIÓN

El cigarro electrónico, también conocido comúnmente como vaporizador (e-cig) es un dispositivo diseñado para sustituir la acción de fumar tabaco por medio de la utilización de una resistencia y una batería para calentar una solución que generar vapor inhalable. El vapor del cigarro electrónico contiene propilenglicol, glicerina vegetal, saborizantes y aditivos como nicotina; aún no existen estudios que demuestren los daños genotóxicos y citotóxicos que provoca su uso [1].

A pesar de numerosos estudios y altas correlaciones de la utilización del tabaco en enfermedades como EPOC, y de acuerdo con la CDC podemos observar que sigue siendo un producto ampliamente utilizado

[2]. El cigarro de tabaco se hace a partir de la planta del tabaco, llamada *Nicotina Tabacum.* El uso de esta junto con el rápido crecimiento de su industria trajo consigo preocupaciones de carácter médico [3]. El cigarro convencional se ha relacionado a un gran número de patologías y alteraciones: Alteraciones del olfato/gusto, disminución del peristaltismo, impedimento de la absorción del complejo B vitamínico, así como interacciones con vitamina C y vitamina A. Así mismo se ha relacionado con infertilidad masculina, hipertensión arterial, diabetes, enfermedades de vías respiratorias y ciertos tipos de cáncer entre otros. Por estas causas nació el *e-cig* como alternativa al uso del cigarro de tabaco convencional sin embargo se deben realizar estudios de los efectos del cigarro electrónico para conocer sus beneficios o el daño a la salud al compararlo con el cigarro convencional [4].

En la actualidad el cigarro electrónico es ampliamente utilizado por personas de diversas edades y grupos sociales. En el año de 1963 Herbert Gilbert patentó por primera vez un "cigarrillo sin tabaco y sin humo" ya que utilizaba en su invento la sustitución de tabaco en combustión y papel por aire aromatizado, caliente y húmedo. Su dispositivo no involucraba nicotina y es tal vez por esto que quedó en el olvido. Sin embargo, en el año de 2003 el farmacéutico Hon Lik patentó lo que hoy se conoce como el e-cig con el propósito específico de ayudar a los fumadores a cambiar su hábito por uno menos dañino [5].

En cuanto al cigarro electrónico, la genotoxicidad, no produce síntomas inmediatos, pero a largo plazo es irreversible y se asocia con estados patológicos. La Organización Mundial de la Salud ha advertido que no reconoce a los cigarrillos electrónicos como una terapia efectiva de reemplazo debido a la falta de estudios que demuestren la efectividad de este como terapia alternativa o si es en algún sentido tóxico o nocivo para los consumidores, sin embargo, no se descarta que puede ser una solución de reemplazo efectiva una vez que se hayan realizado dichos estudios. Existen estudios que han analizado algunos de los componentes del *e-cig*, como la nicotina y el glicerol, así como las impurezas en el líquido utilizado [4]. En Estados Unidos, la FDA aún no aprueba el uso del *e-cig* y pretende en un futuro emitir algún tipo de regulación que incluya a estos dispositivos [7].

Las CMN son marcadores de efecto genotóxico (daño al ADN) que se localizan en el citoplasma; son pequeñas masas de fragmentos rezagados de huso mitótico o cromosomas que no logran incorporarse al núcleo en metafase - anafase, lo que crea estos cuerpos con apariencia de un núcleo pequeño [6]. La prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares es un marcador ampliamente utilizado para estimar el daño genotóxico y citotóxico de agentes químicos, físicos, o biológicos [7]. Por esto, para evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad en el cuerpo del *e-cig* se puede utilizar esta prueba la cual determina presencia de genotoxicidad o citotoxicidad a nivel sistémico y se puede medir en cualquier célula que se replique; en particular se realiza en células de la mucosa oral debido a su facilidad en la obtención de muestra y representa un mínimo riesgo para el sujeto de pruebas [8,9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Sede

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Evaluación de Genotóxicos del Programa Internacional de Medicina, de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Tipo de Estudio

Observacional, Descriptivo, Transversal y Comparativo.

Población de Estudio
Se invitó a participar a 50 personas que utilizan el e-cig que acudían a un centro de venta de insumos para el e-cig, así como a 50 personas no fumadoras sanas de la población general.

Captación de muestras
Las muestras se colectaron de manera consecutiva por conveniencia a partir de enero a junio de 2017.

Consideraciones éticas
Las muestras se tomaron de sujetos mayores de edad quienes aceptaron participar, firmaron el consentimiento informado una vez que se les explicó los objetivos del estudio, así mismo que el riesgo es mínimo y que no tenderían ningún tipo de remuneración económica, además de que se podrían retirar del estudio en el momento que así lo desearan.

Análisis estadístico
Para el análisis estadístico se incluyó promedio, desviación estándar, media, mínimo, máximo y frecuencias, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y Kolmogorov-Smirnov, con la ayuda del programa Start-graphics Centurion XVI.

Método
Todos los participantes que aceptaron su inclusión se les aplicó un cuestionario para identificar variables como edad, sexo, estilo de vida, hábitos nutricionales, otras toxicomanías, entre otros.

Posteriormente se les tomó una muestra de mucosa bucal mediante un rapado gentil de cada carrillo con previo enjugue con agua embotellada, para realizar un frotis sobre portaobjetos codificados. Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron en etanol al 80% por 48 horas. Posteriormente se tiñeron con anaranjado de acridina, se almacenaron en un lugar seguro y libre de polvo y luz hasta el momento de su análisis. Bajo el microscopio (100x) en 2000 células, se identificó la frecuencia de CMN y la presencia de otras anormalidades nucleares tales como CBN, NL, CC, CR, PN y CL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Como se puede ver en la tabla 1, la edad entre ambos grupos fue similar, en los que usan *e-cig* la frecuencia de CMN fue más baja sin embargo las frecuencias de CBN, las CC, CR y las CL fue mayor que en el grupo control.

El cigarro electrónico es un dispositivo que rápidamente está desplazando al cigarro convencional, sin embargo, hay muy pocos estudios sobre sus posibles efectos al material genético, y si bien este daño es silencioso, las consecuencias pueden ser muy dramáticas, por ejemplo, desarrollo de cáncer, envejecimiento prematuro o incluso comprometer la vida de un organismo o la existencia de una especie.

En las personas fumadoras de *e-cig* no se observaron CMN, hay que recordar los micronúcleos son un indicador de efecto que muestra daño genotóxico, pérdida de material genético e inestabilidad del genoma, pero para que se pueda reflejar este tipo de daño mediante esta prueba es una condición que la célula se divida, de lo contrario no será posible la formación de estas estructuras; en este caso como

se observa en la figura 1, los fumadores de *e-cig* presenta alta frecuencia de CBN, estas indican que hubo disturbio durante la citocinesis, de tal suerte que no se logró completar la división celular dando como resultado una célula con dos núcleos y con dificultad para la formación de micronúcleos, y tal vez es por esta razón que los fumadores de *e-cig* no presenten CMN, otro hecho que puede estar influyendo en la ausencia de CMN, es que hay aumento de muerte celular (figura 1) en estas personas.

Tabla 1. Frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en mucosa bucal de personas fumadoras de cigarro electrónico

		Daño al DNA (D-DNA)		Alteración En la Mitosis (A-Mitosis)	Muerte Celular (Muerte)			
	Edad	CMN	NL	CBN	PN	CC	CR	CL
Controles	26.9 ± 8.8	0.6 ± 0.8	2.1 ± 2.12	1.8 ± 1.6	1.6 ± 1.6	0.7 ± 1.2	0.6 ± 1.8	1.8 ± 1.7
p	*0.5*	*0.0003*	*0.1*	*0.001*	*0.9*	*0.0005*	*0.0003*	*0.07*
Fumadores	27.9 ± 8.3	0.1 ± 0.3	1.1 ± 1.1	5.5 ± 2.5	1.8 ± 2.3	2.7 ± 5.9	2.1 ± 3.4	1.4 ± 2.3

Prueba de *Kruskal-Wallis*. Células micronucleadas (CMN) y la presencia de otras anormalidades nucleares como células binucleadas (CBN), nucleos lobulados (NL), cromatina condensadas (CC), cariorexis (CR), picnosis (PN) y cariolisis (CL).

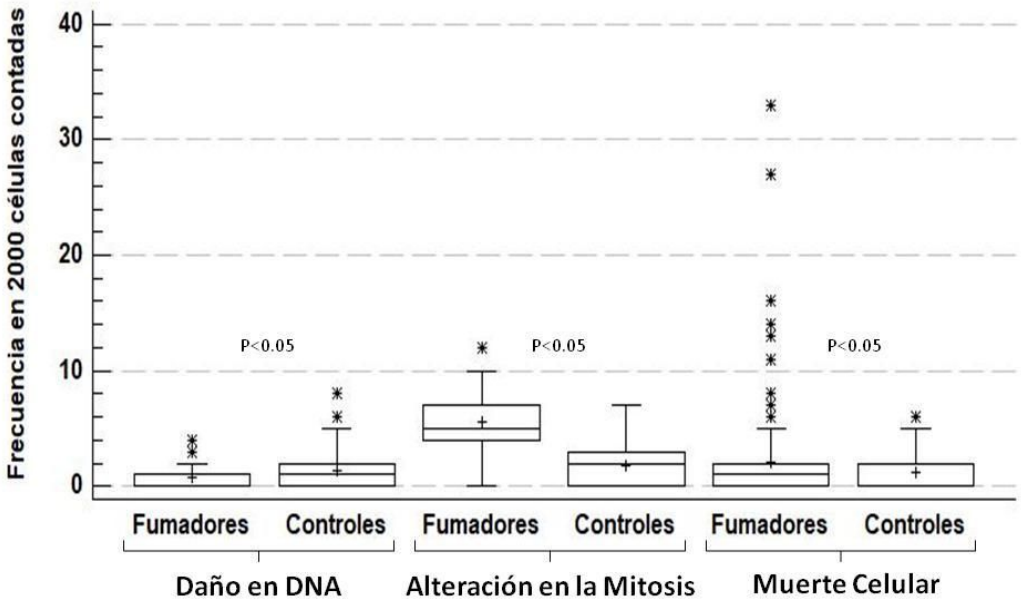


Figura 1. Genotoxicidad y citotoxicidad en fumadore de *e-cig.*
Prueba de Kolmogorov-Smirnov .

CONCLUSIONES

El uso del *e-cig* induce la formación de CBN, CC y CR, las que representan citotoxicidad en el epitelio de mucosa.

REFERENCIAS

[1] Anagha A. Motgi, Mahesh S. Chavan, Nikhil N. Diwan, Asha Chowdhery, Pallavi P. Channe, Mrinal V. Shete. Assessment of cytogenic damage in the form of micronuclei in oral epithelial cells in patients using smokeless and smoked form of tobacco and non-tobacco users and its relevance for oral cancer. Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2014; 10(1): 165-170.

[2] Centers for Disease Control and Prevention. El Tabaquismo y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, disponible en: https://www.cdc.gov/tobacco/campaign/tips/spanish/enfermedades/tabaquismo-enfermedad-pulmonar-obstructiva-cronica.html [last updated 2015 Mar 12; accessed 2015 Nov 11].

[3] de Micheli Alfredo, Izaguirre-Ávila Raúl. Tabaco y tabaquismo en la historia de México y de Europa. Rev. Invest. clín. 2005; 57(4): 608-613.

[4] Martín Ruiz A, Rodríguez Gómez I, Rubio C, Revert C y Hardisson A. Efectos Tóxicos del Tabaco, Revista de Toxicología. Rev. Toxicol. 2004; 21: 64-71.

[5] Grana, R., Benowitz, N., & Glantz, S. A. (2014). E-Cigarettes: A Scientific Review. Circulation, 129(19), 1972–1986.

[6] Schmid W. The micronucleus tests. Mutat Res. 1995; 31:9-15.

[7] Olivia Torres-Bugarín, Maria Guadalupe Zavala-Cerna, Arnulfo Nava, Aurelio Flores Garcia, Maria Luisa Ramos Ibarra. Potential uses, limitations and basic procedures of Micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. Disease Markers. 2014; 2014:956835. Epub 2014 Feb 4.

[8] Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna M, Macriz-Romero N, Flores-García A, Ramos-Ibarra M. Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. El Residente 2013; 8(1): 4-11.

[9] Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra ML. Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. Int J Morphol. 2013; 31(2): 650- 657.

DISEÑO DE UNA NARIZ ELECTRÓNICA CON CAPACIDAD DE RECONOCER VECTOR DEL MAL DE CHAGAS.

[2*]Ruiz-Jiménez, L.F., [1]Duque, J.E., [2]Ortega-Boada, H. y [3]Sierra, D.A.

1. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales- CINTROP. Universidad Industrial de Santander. Colombia
2. Grupo de investigación RadioGis. Universidad Industrial de Santander. Colombia
3. Grupo de investigación CEMOS. Universidad Industrial de Santander. Colombia

*Autor para correspondencia: luisa.ruiz@radiogis.uis.edu.co

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

Los insectos de la subfamilia Triatominae tienen la capacidad de transmitir el parásito Trypanosoma cruzi, causante de la enfermedad de Chagas. En Colombia, la especie Rhodnius prolixus es el vector domiciliado de mayor interés en el área de la salud [1], y una de las problemáticas para implementar soluciones efectivas en el control de la enfermedad y disminución de casos infectados está relacionada con la incapacidad de identificación de estos por los profesionales de la salud sin formación entomológica. Con la detección de volátiles secretados de las glándulas exocrinas de este grupo de insectos de interés médico [2,3], se tiene como objetivo diseñar un dispositivo basado en narices electrónicas con capacidad de reconocimiento de la especie basado en el olor. Para ello, se utilizaron hembras de Rhodnius prolixus expuestas a acetona como control positivo y acetona pura como control negativo con tiempo de adquisición de dos minutos en un volumen de 180 mL. Posteriormente, se adquirieron datos de sensores de diferentes gases [4], donde se seleccionaron y extrajeron características relevantes para implementar un sistema basado en reconocimiento de patrones, de modo que el diseño de la nariz electrónica se basó en la propiedad de escalabilidad a partir del desarrollo del sistema de adquisición y procesamiento de datos independiente, específico y con conexión a servidores remotos. Además, se aplicaron correcciones a nivel electrónico y estructural para facilitar la detección de triatominos. Por último, se observaron variaciones en las respuestas de los sensores de gas cuando se encontraban en presencia de Rhodnius prolixus, por consiguiente, se entrenó una máquina de soporte vectorial (SVM) como clasificador. Se concluye que la nariz diseñada detecta en las hembras de Rhodnius prolixus una huella olorífica particular.

Palabras clave: Detección insectos; Enfermedad de Chagas; Nariz electrónica; Vectores de enfermedades

REFERENCIAS

[1] Ó. Quirós Gómez, N. Jaramillo, V. Angulo, y G. Parra Henao, "Triatoma dimidiata en Colombia; distribución, ecología e importancia epidemiológica," Biomédica Rev. del Inst. Nac. Salud, vol. 37, no. 2, pp. 274–285, 2017

[2] C. A. Zacharias , G. Manrique "Comunicación sexual en triatominos (Heteroptera: Reduviidae): claves químicas asociadas al vuelo y al apareamiento", Ph.D. disertación, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2011.

[3] M. I. Ortiz, "Preliminary evidence of Rhodnius prolixus (Hemiptera: Triatominae) attraction to human skin odour extracts", Acta Tropica, no. 113, pp. 174-179, 2010.

[4] Fonollosa J., Fernandez L, Gutiérrez - Gálvez, Huerta R, Marco S, "Calibration transfer and drift counteraction in chemical sensor arrays using Direct Standardization", Sensors and Actuators B, SNB-20248, 2016.

BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS EXOSOMALES POR INMUNOPROTEÓMICA COMO POSIBLES BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PRÓSTATA.

[1]Sánchez-Soto, J.E., [1]Gutiérrez-Ortega, R.V., [1]Cárdenas-Vargas, A., [1]Hernández-Gutiérrez, R., [2]Hernández-Alva, D.A., [3]Jiménez-Jiménez, M., [1]*Herrera-Rodríguez, S.E.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad de biotecnología medica farmacéutica, Av. Normalistas 800 Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, México 44270
2. Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital General Regional clínica 180, Carretera San Sebastián el Grande 1000 Santa Fe, Tlajomulco, Jalisco, México 45653
3. Hospital Ángeles del Carmen, departamento Ginecología, Tarascos 3473 Frac Monraz, Guadalajara, Jalisco, México 44670.

*Autor para correspondencia: sherrera@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
En México el cáncer de próstata es la principal causa de muerte en hombres. En la actualidad existen distintos métodos para su detección siendo el más empleado el Antígeno Prostático Específico, sin embargo, presenta baja especificidad y sensibilidad, por lo que es necesario la búsqueda de nuevos biomarcadores para la detección del cáncer de próstata. Las proteínas exosomales están implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer; su aislamiento es sencillo ya que provienen de diversos fluidos corporales como orina y sangre; por esta razón, las proteínas exosomales secretadas en el microambiente de células tumorales, tienen la capacidad de funcionar como biomarcadores en la detección del cáncer de próstata. Utilizando metodologías inmunoproteomicas para la identificación y aislamiento de exosomas, hasta el momento se han analizado el tamaño y el perfil proteico en muestras de pacientes con cáncer de próstata e individuos sanos. Se han encontrado dos posibles proteínas como potenciales biomarcadores que contribuyan en la detección oportuna del cáncer de próstata, esperando mejore la especificidad y sensibilidad de lo utilizado en la actualidad.

Palabras clave: Cáncer; próstata; diagnostico; exosomas

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es una neoplasia urológica con aproximadamente 1.1 millones de casos nuevos diagnosticados al año, además es la principal causa de muerte a nivel mundial con 8.2 millones de defunciones [1], siendo en México la primera causa de muerte en hombres[2].

En la actualidad existen métodos de detección donde se utilizan los biomarcadores, estos son moléculas que sirven como indicadores cuantificables de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Con su uso, se espera mejorar la valoración clínica, apoyar evidencias epidemiológicas, pruebas terapéuticas, científicas y fisiopatológicas. Desde la

perspectiva clínica, los biomarcadores tienen un alto impacto sobre el cuidado de los pacientes que sospechen tener alguna enfermedad o que sean genéticamente susceptibles a desarrollarla[3].
El diagnóstico de cáncer presenta ausencia de marcadores específicos. Los niveles plasmáticos de marcadores tumorales existentes pueden llegar a cambiar como consecuencia del estado de la enfermedad, los efectos secundarios de las terapias actuales y la coexistencia de complicaciones clínicas. El antígeno prostático específico (PSA), es el biomarcador tumoral cuyos niveles elevados se relacionan con patologías como la hiperplasia benigna de próstata (BPH) y prostatitis: presenta un nivel muy bajo de especificidad, lo que nos conduce a un diagnóstico erróneo. Cuando los valores de PSA son superiores a 4.0 ng/ml se consideran anormales, sin embargo, los niveles de corte pueden cambiar con la edad, la raza y las condiciones fisiológicas individuales. En la actualidad, los biomarcadores disponibles en el diagnóstico del cáncer no discriminan a los pacientes en las primeras etapas de la enfermedad (falsos negativos)[4].

Debido a que se conoce que los fluidos corporales contienen cantidades sustanciales de vesículas extracelulares (EVs), con tamaños que oscilan entre 30 y 1000 nm[4], estas se han propuesto como posibles biomarcadores en patologías como: el cáncer de riñón, pulmón y páncreas[5]. Lo anterior, se debe a que las EVs derivadas de células tumorales, presentan funciones pleiotrópicas en el medio local o distante, promueven la angiogénesis, disminuyen la vigilancia inmunológica, e incrementan la metástasis[6]. Se describen dos tipos principales de EVs: exosomas nanométricos (30-150 nm) derivados del sistema endosómico, y microvesículas (100-1000 nm) producidas por brotación hacia el exterior de la membrana plasmática. Los exosomas son secretados por la mayoría de los tipos celulares y median la comunicación intercelular dirigida en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, incluyendo diferentes tipos de cáncer. Dado que los exosomas contienen componentes característicos del tipo celular del que provienen, se han propuesto como biomarcadores en una variedad de enfermedades. Dichas características se componen de conjuntos específicos de moléculas que incluyen: proteínas, lípidos, metabolitos y ácidos nucleicos que reflejan la célula fuente[4]. Los exosomas son liberados por las células tumorales y son secretados en diferentes fluidos biológicos, permitiendo su fácil detección [7].

La orina es una muestra sencilla, repetible y no invasiva que sirve como fuente potencial de posibles biomarcadores de patología humanas. En ella se encuentran muchas moléculas y proteínas de limitados tamaños que en condiciones patológicas sufren modificaciones como cambios en la integridad y conformación de su membrana[8].

En este trabajo se propone el uso de exosomas derivados de tumores como posibles biomarcadores para el diagnóstico tumoral, debido a que presentan características moleculares específicas de una patología y pueden aislarse fácilmente de los fluidos corporales. Los exosomas tienen potencial para ser biomarcadores con mayor sensibilidad y especificidad que los biomarcadores clínicos actualmente disponibles. Por lo que es necesario continuar con su estudio para conocer sus propiedades y su relevancia clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de orina

A muestra que corresponde a la segunda orina del día, se le agregó inhibidor de proteasas inmediatamente después de la recolección. La muestra se dejó enfriar en hielo y se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 1000 g, posteriormente la muestra fue almacenada a -80 °C hasta su uso.

Grupos de estudio

Los grupos de estudio se determinaron utilizando la escala de Gleason empleada para medir el grado de agresividad por medio de una biopsia: grupo 1: pacientes sanos; grupo 2: etapa en escala Gleason 1 y 2, cáncer con escasa agresividad, crecimiento lento y por lo tanto de mejor pronóstico; grupo 3: etapa en escala 3, es un cáncer con agresividad intermedia y grupo 4: etapa en escala 4 y 5, es un cáncer de alta agresividad y peor pronóstico.

La metodología general que se empleó en el proyecto se describe de manera general en la siguiente figura.

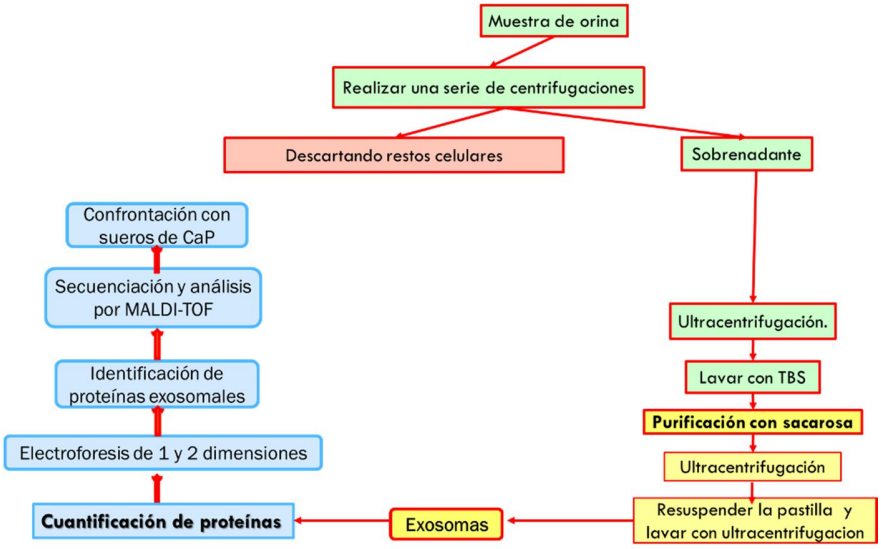


Figura 1: Metodología global para la obtención de posibles biomarcadores.

Fraccionamiento

Los exosomas urinarios se aislaron por centrifugación en serie. La orina se centrifugó a 800 g durante 20 min a temperatura ambiente después el sobrenadante se recuperó y se centrifugó 3200 g durante 30 min a temperatura ambiente y luego a 13000 *rpm* durante 40 min se descartó la pastilla en cada paso[7]. Los exosomas presentes en el sobrenadante se sedimentaron utilizando un kit de aislamiento de exosomas (Total exosome isolation #4478360 Invitrogen) con algunas modificaciones. La muestra se centrifugó a 10000 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los exosomas se resuspendieron con solución salina tamponada de fosfatos (PBS) y finalmente se almacenaron a -80 ° C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas

Las proteínas exosomales se resuspendieron en PBS, se cuantificaron usando un kit de ensayo de BCA (#23225 Thermo scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Precipitación de proteínas con acetona

Se tomó una parte del concentrado de proteínas y agregaron 5 volúmenes de acetona fría. Se mezcló por vortex, y se dejó precipitar por 24 horas a 4C°; transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 13000 rpm 10 minutos hasta obtener una pastilla en el fondo del tubo, se retiró el sobrenadante con

mucho cuidado de no tomar parte de la pastilla, después se lavó la pastilla y se resuspendió con 200 µl de acetona, se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 10 min realizando tres lavados y al final uno adicional con etanol.

Electroforesis bidimensional

Se utilizaron tiras de doble dimensión (Inmobiline dry-strip gel de 7 cm) que se rehidrataron durante la noche en buffer (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS), DTT 1 M, y Buffer IPG (3-10) 20 mM. La primera separación dimensional isoelectroenfoque (IEF), se realizó con el programa automático del equipo. Después que terminó IEF, la tira que contenían las proteínas se pasó a equilibrar por dos subsecuentes pasos de incubación con DTT 1%, y con yodoacetamida 2.5% durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente las proteínas se corrieron en un SDS-PAGE. Las proteínas separadas se visualizarón por tinción, las imágenes de electroforesis 2D fueron capturados utilizando un fotodocumentador de imágenes donde se apreciaron las proteínas, los geles se tiñeron usando un kit de plata (ProteoSilver Plus Silver Stain kit) siguiendo el protocolo del fabricante.

Inmunodetección

Las proteínas se trasfirieron una membrana de nitrocelulosa (NC) y después se realizó un Western Blot. El bloqueó de la membrana se realizó con buffer TBS/Tween al 0.05 % con leche descremada al 5 % se incubó 2 horas a temperatura ambiente, se lavó 5 veces con TBS Tween al 0.1% en shaker vigoroso por 7 minutos. Una vez realizado los lavados, se Incubó el anticuerpo primario diluido en TBS-T (tween 0.05%) con 2.5 % de leche descremada por 3 horas a temperatura ambiente con agitación o toda la noche a 4 grados sin agitación. Se lavó la membrana con buffer TBS-T (tween al 1%) 5 veces. Posteriormente se incubo el anticuerpo secundario (Goat Anti-Human (H+L) HRP conjugate #1721050 BIO-RAD), a la dilución del fabricante en TBS-T (0.05%) por al menos 4 horas a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con buffer TBS-T (Tween al 1%) por 5 veces con shaker. Inmediatamente se revelo con HRP Developer: 0.0100 g HRP, + 2.5 ml metanol frio + 12.5 ml PBS, 30 microlitros de peróxido de hidrogeno. Revelar al menos 45 min a una hora, al menos que antes desarrolle color.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislamiento y caracterización de los exosomas urinarios

La orina se eligió como la fuente de los exosomas debido a su fácil acceso, además de que los exosomas de la orina presentan cambios en su composición. Se procesaron y aislaron exosomas de orina por medio de centrifugación secuencial como se describe en la metodología.

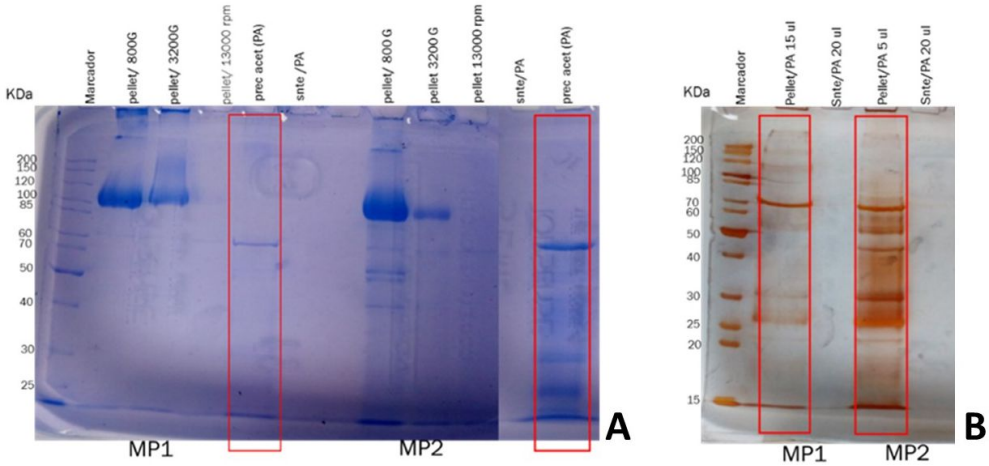


Figura 2: Centrifugaciones secuenciales; A: gel con tinción de coomassie, B: gel con tinción de plata.

Por medio de las centrifugaciones secuenciales se descartó e material no deseado para el aislamiento de exosomas, es decir, los restos celulares mayores a 200 nm, como se puede apreciar en la figura 2. Para estandarizar la metodología, se utilizaron dos muestras de individuos sanos. Cada carril se cargó con 10µg de proteína que se recolectó de cada centrifugación, además de la muestra precipitada con acetona, se realizó una tinción con Coomassie. La imagen 2b corresponde a las muestras de pacientes sanos corridas en gel de poliacrilamida al 12 % con una tinción con plata que permite conocer el perfil proteico de cada muestra. Se realizó el mismo procedimiento con muestras de pacientes con cáncer para determinar la presencia de exosomas como lo menciona la literatura[9] La imagen 3 muestra la tinción con plata de cada muestra, se observó un perfil proteico definido. El perfil se comparó con lo ya reportado por Merchant y colaboradores en el 2016, y de esta manera se observó un patrón de bandeo similar al reportado[10].

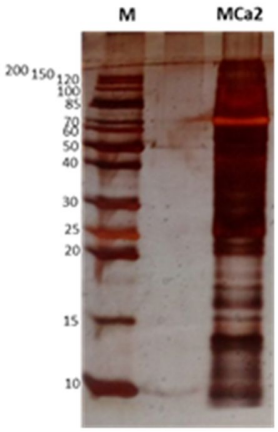


Figura 3: Gel con aislamiento de exosomas.

Para comprobar la presencia de exosomas se procedió a medir las muestras ya aisladas por medio del equipo zeta sizer que nos permitió conocer el tamaño de la partícula. En la figura 4 se describe el tamaño de la partícula obtenida con un promedio de 177 nm, lo que nos indicó que la obtención de exosomas que se encontraron en el rango de 100-200 nm. Con esto se comprobó que nuestra muestra contenía partículas de tamaño de los exosomas como lo reportado en la literatura[9].

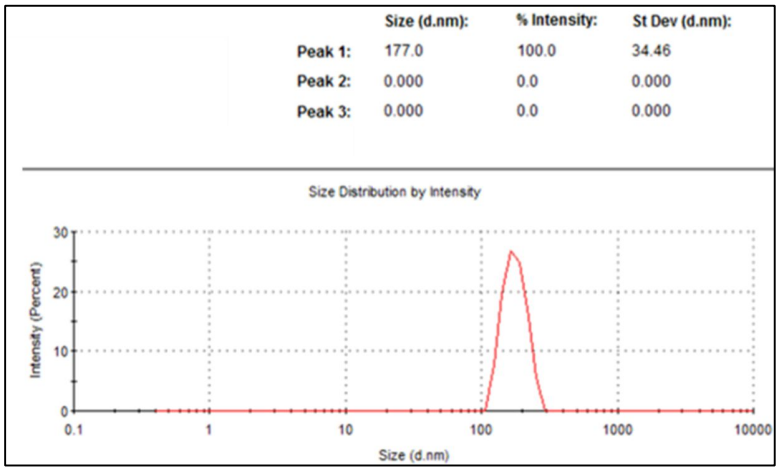


Figura 4: Tamaño de partícula de exosomas aislados.

Detección de biomarcadores por Western blot

Para la determinacion de la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes con cáncer, se realizó un western blot utilizando suero de pacientes con cáncer e individuos sanos (figura 5).

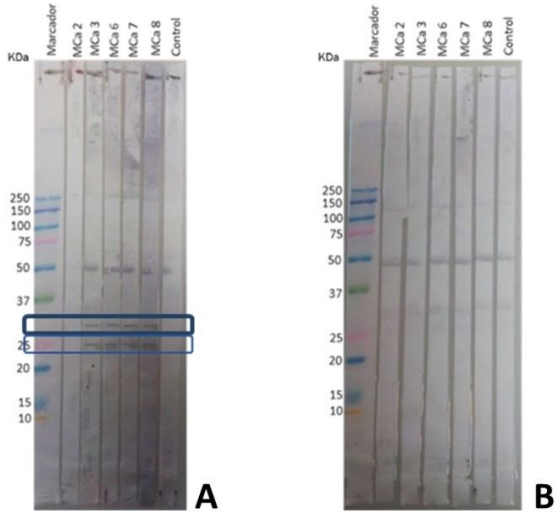


Figura 5: Western blot de muestra de paciente y sano probada con sueros de pacientes y control.

Para determinar la presencia de proteínas exosomales de membrana que fueron diferenciadas y a su vez reconocidas por anticuerpos en suero como antígenos asociados a tumor. En la figura 5A se muestran las tiras que se corrieron con proteínas exosomales de un paciente con cáncer que reaccionaron con

todos los sueros de pacientes con cáncer, se observa la presencia de anticuerpos que reconocieron a proteínas de aproximadamente 25 y 30 kDa de peso molecular, mientras que el suero sano no reconoció esas proteínas. En la figura 5B se muestran las tiras con proteínas exosomales de individuos sanos que fueron probadas con los mismos sueros de pacientes, esto con la finalidad de no tener reacción cruzada, la figura muestra que no hubo ningún anticuerpo diferencial que reconociera proteínas como posible biomarcador solo reconocieron algunas proteínas que están presentes tanto en individuos sanos como en pacientes con cáncer. Se obtuvieron diferencias claras en los niveles de las proteínas probadas entre sanos y pacientes con cáncer de próstata, por lo cual no indicó que se debe seguir procesando muestras para cumplir nuestro objetivo que es identificar y caracterizar biomarcadores a partir de proteínas exosomales en muestras de orina de pacientes con cáncer, para su validación como diagnostico implicado en cáncer de próstata.

Después de haber obtenido un perfil proteico eficiente de las muestras de pacientes e individuos sanos, se procedió a realizar geles de doble dimensión, como se describió en el apartado de metodología, se corrió una muestra de paciente sano para estandarizar las condiciones del equipo y de las muestras, como se aprecia en la figura 6.

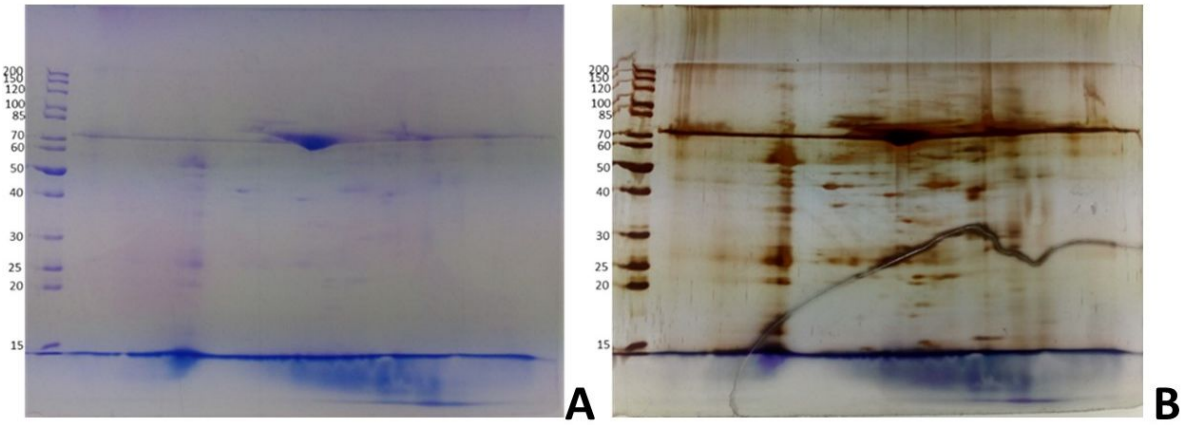


Figura 6: Electroforesis de doble dimensión.

En la figura 6A se muestra una electroforesis de doble dimensión donde se corrió una muestra de proteínas exosomales de individuo sano para determinar su punto isoeléctrico y peso molecular, pero no fue posible la visualización por esa técnica, en la figura 6B se muestra el mismo gel de la doble dimensión teñido con plata, obteniendo una visualización clara de proteínas contenidas en la muestra que pudieron llegar a ser reconocidas por anticuerpos y ser potencialmente biomarcadores futuros.

Hasta el momento se han reconocido varias proteínas exosomales, que pueden llegar a ser potenciales biomarcadores de cáncer de próstata. Sin embargo, el número de muestras analizadas hasta el momento no son las suficientes para validar el uso de estas proteínas, es necesario llevar a cabo un análisis por la técnica de MALDI TOF.

El descubrimiento de biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de próstata es el objetivo principal del estudio. Se necesitan urgentemente biomarcadores más precisos para el diagnóstico temprano y

biomarcadores que distingan claramente a los pacientes con cáncer de próstata y en sus diferentes etapas, así como discriminar con otros padecimientos afines a la glándula prostática. Tratamos de demostrar que las proteínas exosomales identificadas hasta el momento pueden diferenciar entre el cáncer de próstata (principalmente en la escala de Gleason) e individuos sanos, lo que demuestra su potencial diagnóstico.

CONCLUSIONES

Este trabajo tiene como finalidad demostrar el potencial de las proteínas exosomales para su uso como posibles biomarcadores del cáncer de próstata por medio de su detección en orina, además de analizar su contribución para la detección de cáncer de próstata, mismo que se espera sean más específicos y sensibles a los utilizados en la actualidad. Hasta la fecha se continúa trabajando el proyecto y enriqueciéndolo para poder obtener resultados más confiables y precisos que ayuden con el objetivo del trabajo.

REFERENCIAS

[1] M. Plummer, C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, and S. Franceschi, "Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis," *Lancet Glob. Heal.*, vol. 4, no. 9, pp. e609–e616, Sep. 2016.

[2] E. Endzeli *et al.*, "Diagnostic , prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer : a systematic review," *Mol. Cancer*, pp. 1–13, 2016.

[3] N. Goossens, S. Nakagawa, X. Sun, Y. Hoshida, L. C. Program, and T. Cancer, "Cancer biomarker discovery and validation," *HHS Public Acess*, vol. 4, no. 3, pp. 256–269, 2015.

[4] F. Cappello *et al.*, "Reprint of 'EXOSOME LEVELS IN HUMAN BODY FLUIDS: A TUMOR MARKER BY THEMSELVES?,'" *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 98, pp. 64–69, 2017.

[5] M. Nawaz *et al.*, "The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers," *Nat. Rev. Urol.*, vol. 11, no. 12, pp. 688–701, 2014.

[6] K. Junker, J. Heinzelmann, C. Beckham, T. Ochiya, and G. Jenster, "Extracellular Vesicles and Their Role in Urologic Malignancies," *Eur. Urol.*, vol. 70, no. 2, pp. 323–331, 2016.

[7] L. Wang, T. Skotland, V. Berge, K. Sandvig, and A. Llorente, "Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: From mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 98, pp. 80–85, 2017.

[8] L. Santucci *et al.*, "Urine proteome biomarkers in kidney diseases. I. Limits, perspectives, and first focus on normal urine," *Biomark. Insights*, vol. 11, pp. 41–48, 2016.

[9] M. Yáñez-Mó *et al.*, "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 4, no. 2015, pp. 1–60, 2015.

[10] M. L. Merchant *et al.*, "Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS," *Proteomics - Clin. Appl.*, vol. 4, no. 1, pp. 84–96, 2010.

EVALUACION DEL PERFIL CINÉTICO DE LIBERACION DE FÁRMACOS ANTIMICOTICOS EN SOLUCION MICELAR DE COPOLÍMEROS TRIBLOQUE.

Pulido-Urbano, A.T., Guevara-Solis, G.E., Guitierrez-Saucedo, R.A., Martínez-Pérez, E.F., Mendizabal-Mijares, E. y *Figueroa-Ochoa, E.B.

Centro Univesitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Departamento de Quimica, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino Garcia BArragan 31451, Guadalajara, Jal., CP. 44430, México

*Autor para correspondencia: Ing.edgar.figueroa@hotmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

El tratamiento de una amplia gama de enfermedades, incluyendo infecciones virales, bacteriales y fungicidas, consiste en la administración de fármacos hidrófobos; es decir, poco solubles en agua. EN este trabajo de investigación se presenta la capacidad de solubilizacion de la griseofulvina (GSF) y el fluconazol (FLUCO), fármacos antomicoticos y liposolubles en las nanoestructuras micelares formadas por copolimeros tribloque del tipo BOxEOyBOx, donde BO representa el bloque de oxido de butileno, EO el bloque de óxido de etileno, mientras que x, y, son longitud de los bloques. Especificamente los copolimeros utilizados son BO8EO90B=8, BO14EO378BO14, BO20EO411BO20 y BO21EO385BO21.

Palabras clave: Copolímeros tribloque; solucion micelar; griseofulvina; fluconazol; perfil cinético.

REFERENCIAS

[1] M. Elsebahy “Solubilization of docetaxel in poly(ethylene oxide)-block-poly(butylene/styrenme oxyde) micelles”., Biomacromelecules., vol. 8, pp. 2250-2257, 2007.

ANALISIS BIOQUÍMICO Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE SECRECIONES DE GLÁNDULAS PAROTIDAS DE ANUROS.

[1,2*]Peñaloza-Cabrera, A., [1,2]Gutiérrez-Reyna, A., Zamora-Pizano, L., [1]Montalbán-Huidobro, C., [2]Caspeta-Guadarrama, L., [2]Gutiérrez-Villafuerte, Ma. y [2]González-Morales, L.

1. Facultad de Ciencias Biológicas.
2. Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209

*Autor para correspondencia: andreacb754@gmail.com.

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

Las glándulas parótidas de anfibios son una fuente rica de moléculas biológicamente activas con diversas actividades fisiológicas y mecanismo de defensa. Se ha reportado que las secreciones de estas glándulas, contienen diversos componentes bioactivos de interés médico-terapéutico [1,2]. Debido a que existe poca información referente a la presencia de componentes bioactivos en glándulas parótidas de anuros mexicanos, en el presente trabajo, se propuso como objetivo principal, realizar un análisis de los componentes presentes en las secreciones de las glándulas parótidas de Rhinella marina del estado de Colima así como una búsqueda de actividades biológicas, enfocándonos principalmente en actividades enzimáticas y toxicas. El veneno de los sapos se obtuvo por medio de estimulación mecánica de las glándulas parótidas. El perfil cromatográfico de las secreciones se determinó por medio de HPLC fase reversa y el perfil electroforético por medio de SDS-PAGE al 12%. Se realizaron ensayos cualitativos de actividad enzimática (fosfolipasa y proteasa) con los sustratos correspondientes a cada actividad, fosfolípidos y gelatina, respectivamente. Las actividades fueron determinadas por medio de halos de degradación del sustrato observados en el sitio donde fue colocado el veneno total. Los ensayos de toxicidad se realizaron inyectando el veneno total: vía intraperitoneal en mamíferos (ratones) y entre los segmentos 4 y 5 de la parte dorsal de artrópodos (grillos). Se determinó además, la DL50 del veneno total en ratones. Los resultados obtenidos en el perfil cromatográfico, mostraron la presencia de al menos 8 picos mayoritarios. Así mismo, en el perfil electroforético se observaron al menos 12 bandas proteicas con pesos moleculares entre 10 a 180 kDa. En los ensayos enfocados a determinar la presencia de actividades biológicas, se observó baja actividad de degradación del sustrato respecto a otros venenos (Control +), observándose halos de degradación de 2 mm en la actividad fosfolipasa y halos de degradación de 5 mm del sustrato en la actividad proteasa. Por otro lado, en los ensayos de toxicidad se observaron síntomas significativos reportados para otras especies de anuros, se determinó una DL50 de 7.1 mg por cada 20 gramos de ratón. En grillos, solo se observaron síntomas graves de intoxicación como parálisis, que después de cierto tiempo era reversible, indicando que el veneno de las glándulas parótidas no es tan específico para artrópodos.

Palabras clave: Anuros; sapos; veneno total; glándulas parótidas; actividades biológicas.

REFERENCIAS

[1] Clarke, B. T. (1997). The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. Biological Reviews, 72(3), 365-379.

[2] Nalbantsoy, A., Karış, M., Yalcin, H. T., & Göçmen, B. (2016). Biological activities of skin and parotoid gland secretions of bufonid toads (Bufo bufo, Bufo verrucosissimus and Bufotes variabilis) from Turkey. Biomedicine & Pharmacotherapy, 80, 298-303.

PARTÍCULAS MAGNÉTICAS USADAS PARA CAPTURAR DE MANERA EFICIENTE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.

[1*]Oaxaca-Camacho, A.R., [1]Hernández-Gutíerrez, R., [1]Ochoa-Mojica, O.R., y [2]López-Navarro, C.R.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara Jalisco, México. C.P. 44270.
2. Lotto-bio nano laboratorios, Poetas 446, Panorama CP 37160 León, Guanajuato, México.

*Autor para correspondencia: almave15@hotmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
El cáncer de mama es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Los tratamientos basados en la quimioterapia son a menudo demasiado agresivos y no tienen selectividad celular, lo que se refleja como un deterioro en la salud del paciente. En los últimos años, la inmunoterapia ha sido uno de los avances más prometedores en el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos monoclonales están diseñados para dirigirse a antígenos específicos en células cancerosas. Las partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos pueden selectivamente dirigirse a células malignas e inducir apoptosis, minimizando efectos secundarios no deseados y disminuyendo el crecimiento tumoral. El uso de partículas magnéticas conjugadas con el anticuerpo monoclonal "Trastuzumab" específico contra la proteína HER2+ presente en la superficie de células de cáncer de mama HER2+. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un bioconjugado mediante el método de inmovilización. El cual consiste en el que el anticuerpo se fija directamente sobre la superficie de las partículas carboxiladas y se confirmó mediante espectroscopía infrarroja (FTIR) y dispersión dinámica de la luz (DLS). Los resultados mostraron que el bioconjugado captura células SKBR-3 (HER2 +) y con menor eficiencia a las células MCF-7 (HER2-).

Palabras clave: Partículas magnéticas, anticuerpo monoclonal, captura de células.

INTRODUCCIÓN

La organización mundial de la salud define el cáncer como un término genérico que se designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, se caracteriza por proceso de crecimiento y diseminación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina “metástasis”, la cual es la principal causa de muerte por cáncer. [1] Actualmente el cáncer de mama representa la primera causa de mortalidad por neoplasia a nivel mundial en las mujeres con cerca de 500 mil decesos cada año, de las cuales el 70% ocurre en países en desarrollo. En el 2016 hubo una taza de incidencia de cáncer de mama en México aproximadamente de 11,692 casos, específicamente para el estado de Jalisco se reportaron aproximadamente 1076 casos [2]. A partir de 2006 éste ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino [3]. Una vez que se ha detectado esta enfermedad, el tratamiento más común es la quimioterapia. Durante la fase inicial de la quimioterapia,

un fármaco anticancerígeno mata la mayoría de las células cancerosas. Sin embargo, no todas las células mueren y las células cancerosas que sobreviven se vuelven resistentes no sólo a los fármacos que eran utilizados anteriormente para el tratamiento, sino también a muchos fármacos con mecanismos distintos contra el cáncer [4].

La proteína HER-2/neu se encuentra sobreexpresada entre un 25% a 30% de los cánceres de mama; así, el oncogén HER2/neu está directamente asociado con la transformación de las células epiteliales hacia la malignidad. Se estima que las células epiteliales normales tienen entre 20,000 y 50,000 receptores HER2/neu de membrana, mientras que las células tumorales en cáncer de mama que sobreexpresan el HER2/neu pueden llegar a tener hasta 2 millones de receptores en su membrana [5]. El cáncer de mama con sobreexpresión de HER2/neu suele tener un fenotipo de tumor agresivo y características histológicas particulares, como son: i) alto grado nuclear, ii) actividad mitótica aumentada (alta fracción de la fase S) y iii) ausencia de receptores hormonales. Se considera la sobreexpresión de HER2/neu como un marcador de mal pronóstico y de potencial utilización como diana terapéutica, válida para el tratamiento de esta enfermedad con el uso de anticuerpos monoclonales específicos que se unen al dominio extracelular del receptor, como el trastuzumab [6]. Es el primer anticuerpo aprobado para uso terapéutico y el primer tratamiento oncogénico dirigido con beneficio de supervivencia en mujeres con HER2 positivo mestastásico [7]. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un conjugado empleando nanopartículas de magnetita acopladas a un anticuerpo monoclonal.

La nanotecnología se está convirtiendo en un nuevo campo de investigación interdisciplinaria, a través de la biología, la química, la ingeniería y la medicina, se espera que conduzca a importantes avances en la detección del cáncer y el tratamiento. [8]. Un claro ejemplo de lo anterior es el uso de nanopartículas magnéticas que se han empleado para imagenología como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), reparación de tejido, hipertermia, acarreadores de fármacos. [9] Los esfuerzos recientes se han centrado en el desarrollo de nanopartículas funcionalizadas para el suministro de agentes terapéuticos a dianas moleculares específicas sobreexpresados en diferentes células cancerosas, o bien, que estas nanopartículas se dirijan selectivamente a células cancerosas. Con lo que se pretende lograr tiempos de circulación más largos, estabilidad y biodisponibilidad dentro del organismo. [10, 11 y 12].

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Nanopartículas de Magentita (Fe_3O_4) (NPFe) proporcionada por el grupo de trabajo de Lotto-bio nano laboratorios, ácido 16-mercaptohexadecanoico, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidroclorado) y 10 mg/ml NHS (N-hydroxisuccinimida) (Sigma Aldrich).

Activación de la superficie

Uno de los mejores conectores para la conjugación de nanopartículas y anticuerpos son los grupos carboxilos (COOH), que pueden formar un enlace covalente con el grupo amino de los anticuerpos monoclonales.

Se empleó una solución 20mM de 16 MHA (ácido 16-mercaptohexadecanoico), la cual se agregó a 25mg de NPFe y se dejó sonicar 48 hrs a temperatura ambiente.

Se lavó con etanol, con la finalidad de retirar el excedente de 16 MHA que no reacciono con las NPFe, finalmente se resuspendieron en etanol para tener una concentración final de 4mg/ml. Las NPFe se guardan a 4°C hasta su uso.

Funcionalización del anticuerpo monoclonal a la magnetita

Una vez activada la superficie, se empleó el método de cabodiimida para unir las NPFe con el anticuerpo monoclonal (Trastuzumab), el cual tiende a formar un enlace covalente entre estos componentes. Se tomaron 500 ul de NPFe y se lavaron dos veces con PBS. Las NPFe se resuspendieron en PBS, 1mg/ml de trastuzumab, 20mg/ml EDC y 10 mg/ml NHS, se dejaron reaccionar por 24 horas a 4°C y 100 rpm. Para remover el exceso de reactivos se lavaron con PBS.

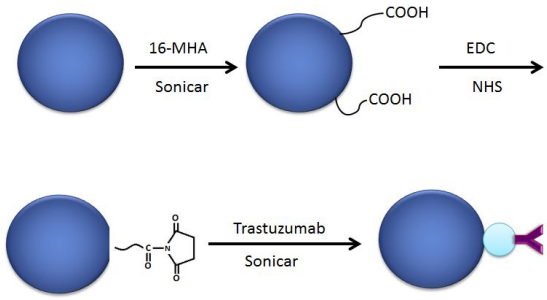


Figura 1. Esquema general de la conjugación de las NPFe con el anticuerpo monoclonal Trastuzumab

El acoplamiento de las NPFe al anticuerpo, fue comprobado por espectroscopia infrarrojo FTIR y difracción dinámica de luz DLS.

Cultivo celular

Las líneas celulares que se emplearon son las siguientes: SKBR-3 y BT474/GFP cáncer de mama HEr2+; y MCF7 cáncer de mama Her2-.

Las células SK-BR-3 y MCF7 fueron cultivas con medio DMEM (Sigma Aldrich), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (By products), 5% de CO_2 y 37°C en un frasco de 75 cm^3, llevadas a una confluencia del 100%.

Captura de células cancerígenas

Para realizar la prueba de captura las células, se decantó el medio de las cajas, seguido de dos lavados con PBS, para desprender las células con EDTA 1% (p/v) en PBS. El líquido se recolecto y centrifugó a 1500 rpm por 5 min, el pellet se resuspendió en 5 ml de PBS. Con azul de tripano se contaron la cantidad de células presentes en PBS.

Se tomaron 100ul de NPFe-Ab para cada línea celular, se agregaron $5x10^5$ células a cada muestra de NPFe-Ab. Se dejaron en agitación constante por 1hr a temperatura ambiente.

Una vez transcurrida la hora, se colocó el tubo en él magneto para poder separar las NPFe-Ab con las células (figura 2), el sobrenadante se recolectó en un tubo ependorf para su análisis en microscopia de campo claro.

Las NPFe-Ab con células se lavan dos veces con PBS, usando el magneto de supermacs, finalmente se resuspenden en 500 ul de PBS para el análisis en microscopia de campo claro.

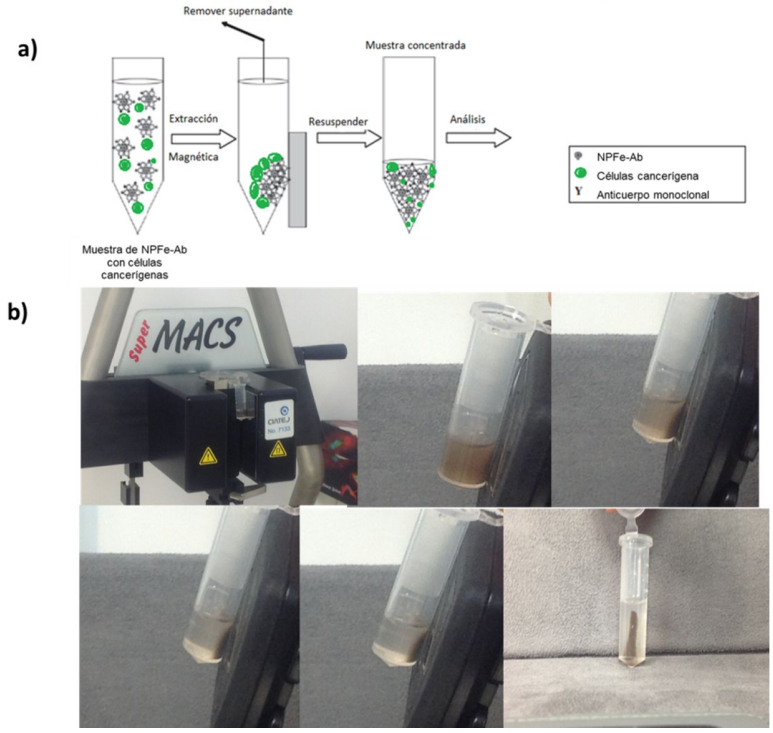


Figura 2. a) esquema general de la captura de células cancerígenas, b) uso del magneto para retener las NPFe-Ab que atraparon a las células cancerígenas, después de 1min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del conjugado NPFe-Ab

La técnica de DLS es útil para medir el tamaño de partícula. Se midieron las nanopartículas magnéticas antes de ser conjugadas y después, estas mostraron un tamaño inicial de 433.2nm y un tamaño final de 853.2 nm, el tamaño final nos indica que el anticuerpo se unió a la nanopartícula, este resultado es cualitativo. Como se observa en la figura 3.

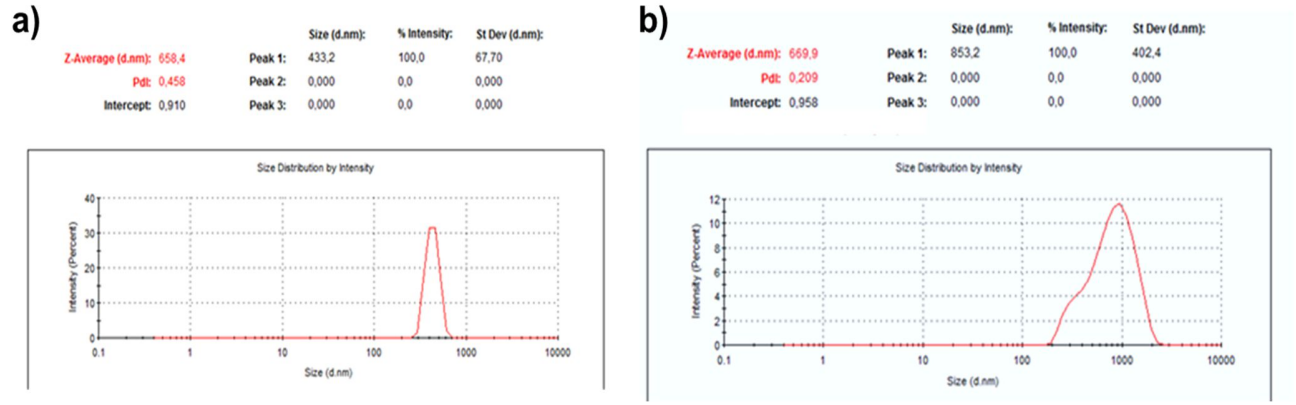


Figura 3. Medición del tamaño por medio de la técnica de DLS. a) nanopartículas de magnetita, b) nanopartículas de magnetita conjugadas con el anticuerpo.

La espectroscopia infrarrojo nos ayuda a detectar los grupos funcionales presentes en la muestra que se está analizando.

En la figura 4 se observa el espectro infrarrojo de Trastuzumab, las NPFe y el conjugado NPFe-Ab. La línea en negro corresponde a las NPFe, la cual presenta dos picos característicos de la magnetita, el primero en 1700 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace Fe-O, y el segundo en 3400 cm^{-1} a la vibración del enlace O-H.

La línea en rosa corresponde al anticuerpo monoclonal de Trastuzumab donde se pueden observar los picos característicos de una amida secundaria aproximadamente en 1650 cm^{-1}, encontramos el grupo N-H en 3500 cm^{-1}, en 3000 cm^{-1} C-H y 1762 cm^{-1} corresponde a el enlace C=O.

La línea en azul corresponde al conjugado NPFe-Ab, en el cual podemos observar que el pico de Fe-O se desplazó a1750 cm-1, lo que indica que hubo una interacción con el anticuerpo, por otra parte la banda de C-H en 3000 cm-1 también se encuentra presente, al igual que la banda de N-H en 1640 cm-1, estos datos nos indican que hubo un enlace entre ambos reactivos.

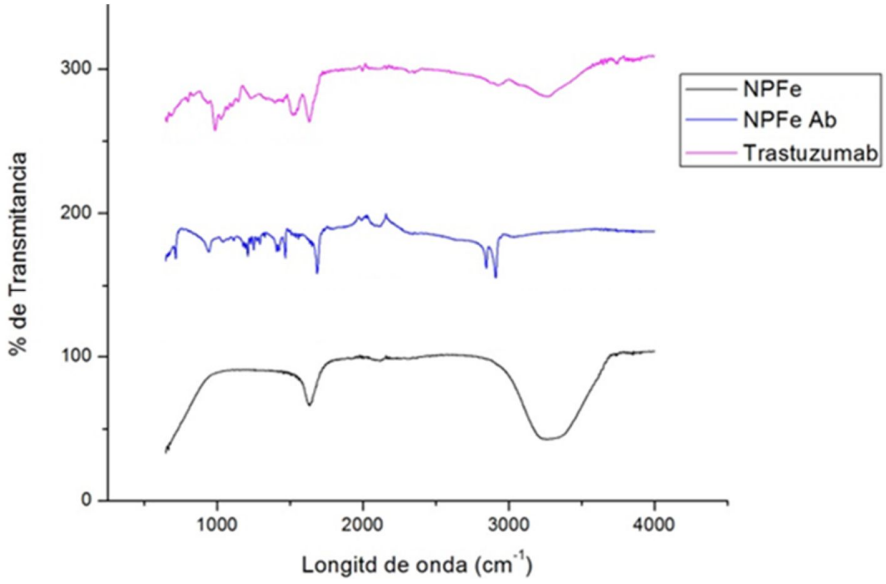


Figura 4. Espectro Infrarrojo de las nanopartículas de magnetita, las nanopartículas conjugadas con el anticuerpo Trastuzumab y finalmente el anticuerpo monoclonal

Captura de las células cancerígenas

En la figura 5 se observan las imágenes obtenidas con un microscopio de campo claro de las muestras que se obtuvieron después de que las NPFe-Ab capturaran células cancerígenas. En el primer recuadro tenemos las células SKBR-3 que sobre expresan en su membrana la proteína HER2+, estas fueron atrapadas con el magneto, las flechas rojas señalan a las células y las flechas verdes señalan las partículas magnéticas, como podemos observar la muestra contiene gran cantidad de células y partículas magnéticas. Lo que nos indica que la captura fue eficiente. Ahora bien, el sobrenadante que se retiró mientras que las partículas se encontraban atraídas por el magneto, se observó en el microscopio y el resultado que obtuvimos fue que encontramos poca cantidad de células en él, y no se

alcanzaban a distinguir las NPFe-Ab. El segundo recuadro pertenece a las células MCF-7 que no sobre expresan la proteína HER2+, cuando las partículas son atraídas al magneto esta no capturo células, como se observa en la imagen las flechas en rojo muestran a las células y las verdes a las partículas magnéticas. Se ve una mayor cantidad de partículas magnéticas comparado con el sobrenadante, donde solo observamos células.

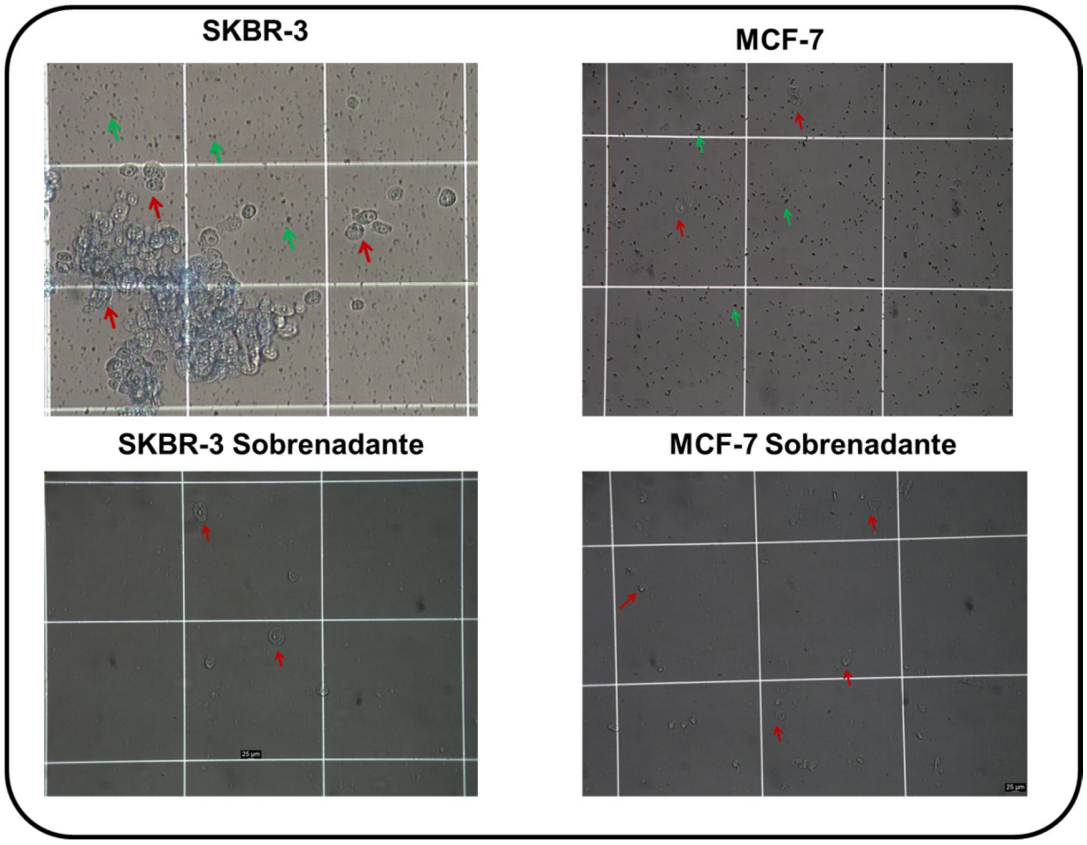


Figura 5. Imágenes de miscroscopía con un aumento de 20x, para las células cancerígenas capturadas con las partículas magnéticas y con el sobrenadante recuperado.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un conjugado NPFe-Ab el cual fue comprobado por medio de la técnica de FTIR y DLS. Este conjugado se hizo interactuar con células cancerígenas las cuales sobreexpresan la proteína HER2+, las cuales fueron capturadas eficientemente, esto se comprobó con imágenes de microscopia de campo claro, mientras que las células HER2- no fueron capturadas con tanta eficacia como las SKBR-3.

Por lo tanto, este conjugado puede usarse para dirigirse a células cancerígenas específicas y después inducir hipertermia.

REFERENCIAS

[1] Cáncer, Organización Mundial de la salud, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/, visto 18 Septiembre 2017

[2] BoletínEpidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información, https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico,visto 19 Septiembre 2017

[3] C. Jesús, B. Juan, E. Aura, "Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario", *Elsiver*, 6 revisión, pp. 10-13, 2015

[4] M. Tamara, R. Lorna, P. Vitaly, "Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 65, pp. 1880–1895, 2013

[5]. J. Horton, "Her2 and trastuzumab in breast cancer", *Cancer Control*, Vol. 8, no.1, pp. 103-10, 2001

[6]. DJ Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2" *N Engl J Med*, Vol. 344, no. 11, pp.783-92, 2001

[7] J. Baselga and J. Albanell, "Mechanism of action of anti-H ER2 monoclonal antibodies", *Annals of Oncology*, Vol. 12, pp. S35-S41, 2001

[8] N. Shuming, J. Yun Xing, Gloria, and S. Jonathan, "Nanotechnology Applications in Cancer", *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 9, pp.257–88, 2007

[9] A. Kumar Gupta, M. Gupta, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications", *Biomaterials,* Vol. 26, pp. 3995–4021, 2005

[10] Z. Yi, A. Daria, K. Alexander, "Can nanomedicines kill cancer stem cells?", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 65, pp. 1763–1783, 2013

[11] Vanna S., Nicolino P., Mario S., (2014). "Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer", International Journal of Nanomedicine, 9 467–483.

[12] P. Ji-Ho, G. Luo, M. von Geoffrey, R. ErKki, B. Sangeeta, and J. S. Michael, "Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications", *Nat Mater*. Vol. 8, no. 4, pp. 331–336, 2009.

PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECCIÓN Y CONTROL DE BROTES DE INFLUENZA TIPO A (H5 Y H7) EN AVES DE GRANJA.

[1]Pérez-Padilla, N.A., [1]Nuño-Ayala, A., [1]Nuño-Ayala, J.L., [1]Miranda-Astiazarán, E., [2]Licea-Navarro, A.F., y [1*]Lugo-Fabres, P.H.

1. Unima Diagnósticos de México S de RL de CV, De los Mosqueteros 4181, Villa Universitaria, Zapopan, Jalisco, México 45110.
2. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Carretera Ensenada-Tijuana No. 3918, Zona Playitas, Ensenada, Baja California,
México 22860.

*Autor para correspondencia: pavel.lugo@unima.com.mx
Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
Actualmente, la OIE define a la influenza aviar como "una infección de las aves de corral causada por cualquier virus de influenza de tipo A perteneciente a los subtipos H5 o H7 o por cualquier virus de influenza de tipo A con un índice de patogenicidad intravenosa que cause mortalidad en mínimo el 75% de los casos". Identificar un brote de influenza toma de 2 a 3 días usando los métodos convencionales de diagnóstico, lo que genera un alto riesgo de propagación de la enfermedad dentro y fuera de la granja afectada ya que dichas alertas son emitidas días después del inicio de la infección. En este trabajo, se presenta una prueba rápida de diagnóstico serológico con el cual es posible detectar la infección viral en el organismo en 10 min, en el sitio de prueba y a bajo costo, mediante el uso de una tecnología basada en un fragmento de anticuerpo de dominio sencillo quimérico fijado en una matriz de celulosa. El resultado es analizado por un software que realiza algoritmos de inteligencia artificial en un smartphone y permite un monitoreo en tiempo real para el control de brotes de la enfermedad y la propagación del mismo.

Palabras clave: Diagnóstico; influenza; vigilancia epidemiológica.

INTRODUCCIÓN

La influenza aviar es ocasionada por el virus de la familia orthomyxoviridae, del género influenza tipo A, el cual es encontrado en el medio ambiente y puede infectar tanto aves silvestres como de corral [1], [2].

Los virus de la influenza tipo A son de ARN de cadena simple y poseen una envoltura lipoproteica donde se encuentran las glucoproteínas hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N), las cuales inducen la inmunidad en el huésped y favorecen el proceso infeccioso. Basada en la antigenicidad de estas glicoproteínas los virus influenza han sido subdivididos en 18 subtipos de H y 11 N. La infección con el subtipo H5 o H7 tiene un índice de mortalidad mayor al 90% dentro de las primeras 48 horas, siendo estas las variantes de mayor patogenicidad [1], [3], [4].

El virus es transmitido a través de las secreciones nasales, saliva y heces, por lo cual las aves pueden ser infectadas por el contacto directo o por el entorno en el que ha habitado el organismo infectado. Para la prevención de una pandemia, productores y autoridades colaboran con alertas de brotes del virus que, de confirmarse, pueden resultar en el sacrificio de las aves afectadas, lo cual puede impactar seriamente a un productor avícola [2]–[4].

Para la detección del virus en aves se emplean diferentes técnicas, las cuales pueden dividirse en la detección del agente viral y de niveles de anticuerpos. En la figura 1 se muestra un diagrama de flujo de los métodos diagnósticos para la influenza aviar A actualmente empleados en los laboratorios veterinarios.

Para la detección del agente viral, se emplea la técnica de amplificación genética RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) y el cultivo de embriones. La RT-PCR consiste en la amplificación logarítmica de un segmento de ADN con una secuencia complementaria las cuales corresponden a segmentos de las secuencias génicas del virus, sin embargo, solo pueden detectar el tipo o subtipo específico del virus y no sus variantes [2], [3].

El aislamiento del virus mediante el cultivo de huevos embrionarios es de los métodos más sensibles, sin embargo, debido a los periodos de incubación y a la disposición de huevos embrionados, el diagnóstico puede tardar de 1 a 2 semanas. La técnica consiste en inocular los huevos embrionarios con la muestra previamente extraída y pre-tratada, seguidos por periodos de incubación. Finalmente, se cosechan los fluidos y, después de un tratamiento, se determina su actividad hemaglutinante mediante la inhibición de la hemaglutinación (IHA) [2], [3].

Los niveles de anticuerpos son evaluados por las técnicas de IHA, inmunodifusión en agar (IDA) y el ensayo inmuno-enzimático (ELISA). La identificación del virus por IHA es altamente específica y sensible, pero se requieren antisueros de los 16 subtipos de H, las cuales tienen la propiedad aglutinante de los glóbulos rojos con lo que constituye el principio de la técnica. El ensayo consiste en una serie de titulaciones donde se agregan diluciones de la muestra y del control a eritrocitos previamente lavados. El título de anticuerpos correspondiente es la dilución más alta del antisuero de referencia que inhibe totalmente la hemaglutinación [2], [3].

La técnica IDA es específica, pero de baja sensibilidad y tarda de 2 a 3 días. El método está basado en la migración del antígeno y el anticuerpo en un medio de agar donde puede observarse un resultado positivo cuando una línea de precipitación se forma entre el antígeno positivo y la muestra de suero [5]. La prueba ELISA es más sensible, más compleja, menos específica y tarda de 1 a 2 días. [2], [6].

Los métodos actuales de detección del virus de la influenza A ofrecen un diagnóstico tardío con tiempo mínimo de 2 a 3 días para obtener el resultado, además de que algunas requieren material y equipo de laboratorio especializados o son poco específicas. Para prevenir nuevos brotes o pandemias es necesario emplear un método diagnóstico rápido, económico y en el sitio de prueba, que además te permita monitorear en tiempo real los resultados obtenidos en cualquier granja.

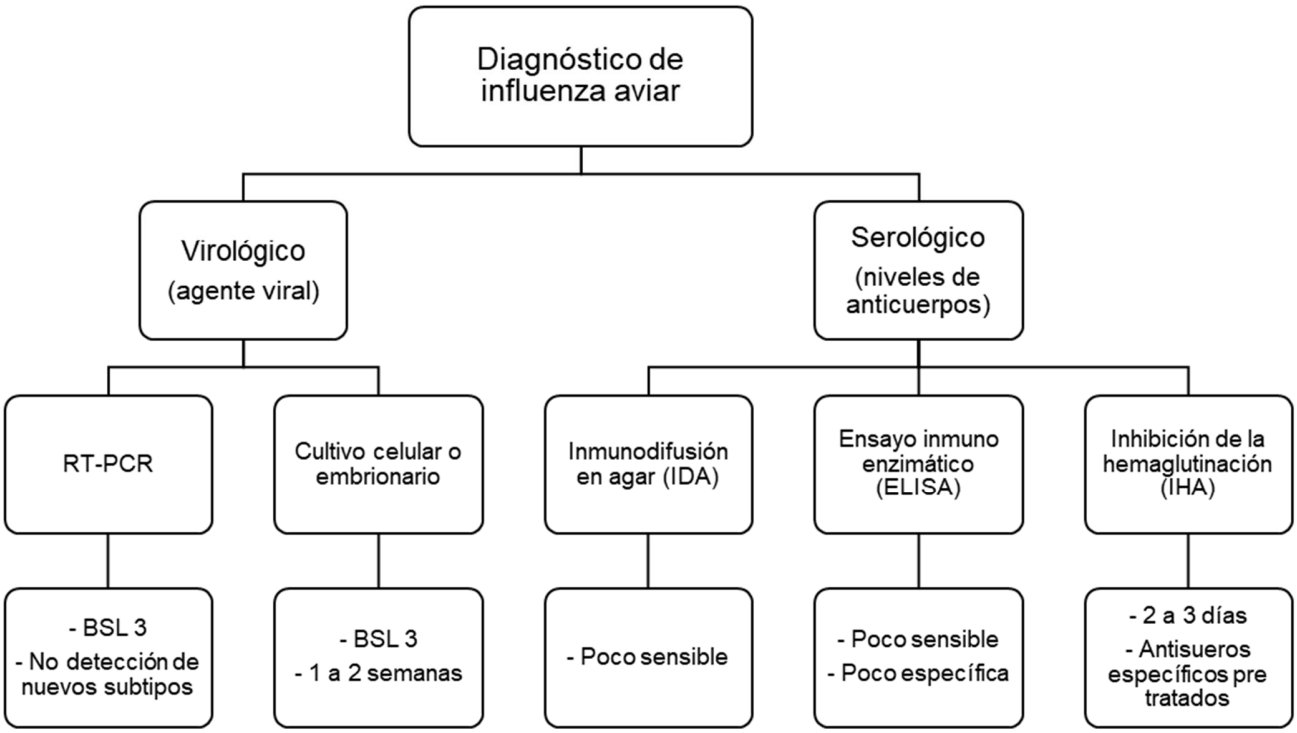


Figura 1. Diagrama de flujo de los métodos diagnósticos para influenza aviar [2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y análisis de muestras

Se obtuvieron por donación 105 sueros inactivados de gallina de postura de diferentes edades: 70 de 36 semanas, 18 de 56 semanas y 17 de 70 semanas. Los sueros se mantuvieron en cadena de frio durante el transporte y se almacenaron a 4 °C posterior al análisis. Las muestras se analizaron contra el virus de la influenza A (H5 y H7) por el método de inhibición de la aglutinación (IHA) en un laboratorio de referencia.

La sangre se obtuvo mediante punción venosa del ala de un ave de engorda de 7 semanas, posteriormente fue disuelta en la solución anti aglutinante ALSEVER, con una relación 1:1. la prueba con la tarjeta diagnóstica se realizó al día siguiente de la toma de la sangre.

Prueba diagnóstica

Los eritrocitos de gallina fueron lavados con PBS 1x y enriquecidos con los sueros donados de manera individual; se emplearon 15 µL de cada suero para el análisis. La sangre reconstituida fue colocada en una matriz de celulosa pre tratada con anticuerpos de dominio sencillo quiméricos conjugados con el epítopo NS1 y con H5. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y a doble ciego. Se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y se procedió al proceso de análisis por el software utilizando un smartphone con cámara de 1 Mp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los sueros analizados por el método de IHA presentaron títulos mayores a 256, lo cual se considera como positivo (presencia de la infección) para el virus de la influenza A por la OIE [3]. En la prueba rápida de diagnóstico desarrollada, la sangre reconstituida con los sueros y colocada en la tarjeta diagnóstica, mostró reacciones visuales reconocibles por el software como casos positivos a la enfermedad (figura 1), resultando como positivas las 105 muestras de suero (Tabla 1).

Comparando los resultados obtenidos por IHA y con la prueba diagnóstica podemos observar una correspondencia del 100% (coinciden en su totalidad), demostrando que es factible detectar la presencia del virus en aves de corral de manera rápida, sencilla y con poca muestra. Así mismo, se observó que los resultados obtenidos con sueros de gallinas de diferentes semanas fueron homogéneos; tampoco se encontró evidencia de incompatibilidad o alguna reacción cruzada de los eritrocitos lavados con los sueros problema, es decir, la muestra reconstituida estaba en buen estado al colocarla en la matriz.

La situación global de brotes de influenza por la cepa H5 (N1, N2, N5, N6 y N8) y H7 (N3 y N9) hasta junio del presente año, dejó como resultado 34 países afectados y 2,457,632 aves sacrificadas [7]. El acceso a un diagnóstico oportuno puede evitar el sacrificio de las aves y, por ende, las afectaciones en múltiples países.

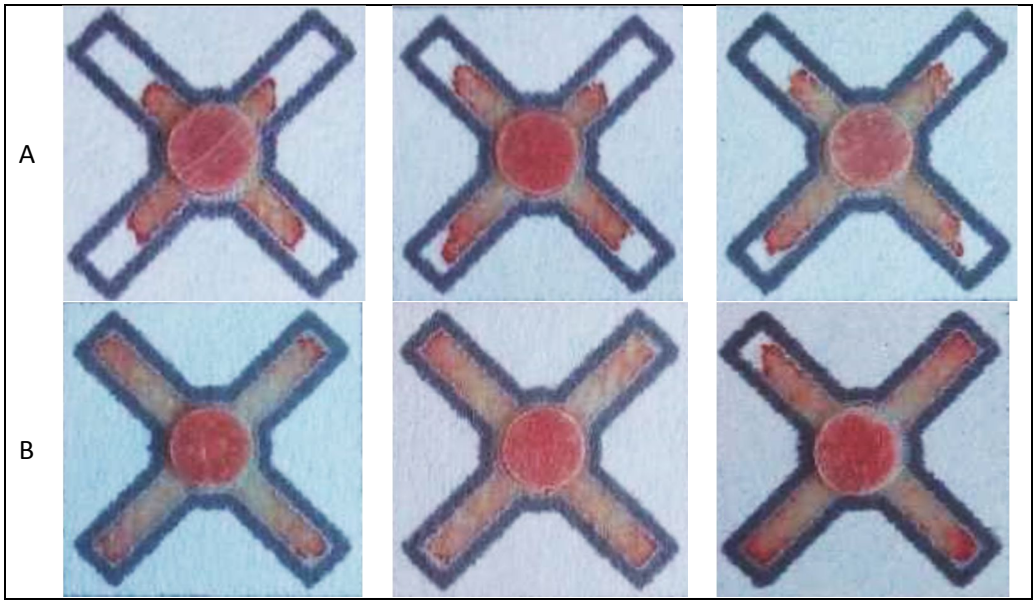


Figura 2. Prueba de diagnóstico rápida en sangre reconstituida con suero. A: muestra de suero positivo. B: muestra de control negativo.

Tabla 1. Resultados de la prueba rápida de diagnóstico para el virus de la influenza aviar tipo A (H5 o H7), donde se muestra la eficiencia del 100% de la prueba.

Edad de las gallinas (semanas)	Cantidad de sueros de Gallina	Muestras positivas en la prueba de IHA	Resultados acertados en la prueba rápida
36	70	70	70
56	18	18	18
70	17	17	17

CONCLUSIONES

La prueba de diagnóstico rápida obtuvo una eficiencia y correlación del 100% con los valores referidos de IHA, permitiendo analizar y obtener resultados de más de 100 muestras en un periodo menor a 3 horas.

En esta primera aproximación, los sueros problema fueron analizados en un proceso que incluyó el lavado de eritrocitos. El método diagnóstico final empleará sangre total del organismo extraída *in situ*, de tal manera que se pueda identificar la evidencia de infección por influenza A en un tiempo no mayor a 15 min.

Este nuevo método como plataforma para el diagnóstico de la infección del virus de la influenza A se proyecta como una prueba versátil en el monitoreo y control de brotes infecciosos en granjas avícolas.

REFERENCIAS

[1] World Health Organization, "Avian influenza: assessing the pandemic threat," *World Heal. Organ.*, p. 64, 2005.

[2] OPS, "DIAGNOSTICO DE VIRUS INFLUENZA Procedimientos de Diagnóstico del Virus Influenza en Mamíferos y Aves," *Man. OPS*, p. 64, 2010.

[3] (OIE) World Organization for Animal Health, "Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses)," *Man. Diagnostic Tests Vaccines Terr. Anim.*, pp. 1–23, 2016.

[4] Centers for Disease Control and Prevention CDC, "Influenza Type A Viruses | Avian Influenza (Flu)." [Online]. Available: https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm. [Accessed: 20-Sep-2017].

[5] M. B. Mariana *et al.*, "Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a soluble recombinant nucleoprotein for the detection of antibodies to avian influenza virus," *African J. Microbiol. Res.*, vol. 11, no. 18, pp. 697–704, May 2017.

[6] A. Comin, N. Toft, A. Stegeman, D. Klinkenberg, and S. Marangon, "Serological diagnosis of avian influenza in poultry: is the haemagglutination inhibition test really the 'gold standard'?," *Influenza Other Respi. Viruses*, vol. 7, no. 3, pp. 257–264, May 2013.

[7] O. I. E. S. Report and A. Influenza, "OIE Situation Report for Avian Influenza Members . The objective is to describe what is happening currently , explain what we are Current Global Situation (ongoing outbreaks as of 06 of June 2017)," no. June, pp. 1–13, 2017.

DETECCIÓN IN SITU DE TUBERCULOSIS Y VIH MEDIANTE UNA NUEVA TECNOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO EN SUSTRATO SÓLIDO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS CON INTELIGENCIA ARTIFICIAL.

[1*]Lugo-Fabres, P.H., [1]Nuño-Ayala, A., [1]Pérez-Padilla, N.A., [1]Miranda-Astiazaran, E., [2]Licea-Navarro, A.F., y [1]Nuño-Ayala, J.L.

1. Unima Diagnósticos de México, 45110
2. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Departamento de Innovación Biomédica, 22860.

*Autor para correspondencia: pavel.lugo@unima.com.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
La Tuberculosis (TB) es una de las principales causas de mortalidad por enfermedad infecciosa a nivel global, generando más de 10 millones de nuevos casos al año de los cuales 95% se concentran en los países en vías de desarrollo [1], sin embargo, las técnicas actuales de diagnóstico de la enfermedad requieren el uso de laboratorios y técnicos especializados los cuales son de alto costo para los Sistemas de Salud y no están disponibles en contextos de recursos limitados. El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una prueba rápida *in situ*, de bajo costo y de monitoreo de la enfermedad en tiempo real que pueda ser utilizada incluso por personal sin preparación técnica especializada. La tecnología está basada en la captura de biomarcadores en sangre *ex vivo*, a través de un anticuerpo quimérico recombinante depositado en un sustrato sólido que genera una reacción visual evaluada a través de un software de análisis de imágenes e inteligencia artificial en un Smartphone. Los resultados se compararon con los diagnósticos oficiales de los pacientes y se calcularon los parámetros de precisión de la prueba obteniendo una sensibilidad de 100% y especificidad del 95%.

Palabras clave: Clave Tuberculosis, Smartphone, Diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad para establecer el diagnóstico de tuberculosis en México es necesario seguir la NOM-006-SSA2-1993 [2] y llevar un protocolo donde se realicen baciloscopias seriadas y cultivo en los casos donde la clínica o datos radiológicos sugieran infección por M. tuberculosis, tardando en algunos casos hasta 3 meses en obtener el resultado. Es necesario un método diagnóstico que determine de manera rápida, sensible y específica la existencia de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes donde clínicamente no se presentan datos de infección aguda o simplemente su cuadro es incipiente y en pacientes donde la infección no presenta cuadro clínico respiratorio [2]. Para establecer el diagnóstico de tuberculosis en humanos, se han desarrollado pruebas *in vitro* basadas en el reconocimiento y detección de ESAT-6 y CFP 10 [3], bajo el principio de una intradermorreacción como en el PPD con ensayos realizados en bovinos y murinos, no así en humanos ya que no se ha explorado por completo la virulencia de la proteína. Otra prueba empleada, es el ensayo que consiste en la proliferación de linfocitos T (de pacientes sensibilizados con micobacterias) puestos en contacto con ESAT-6 recombinante, esta prueba es sensible y específica, pero tiene las desventajas propias de una

prueba que requiere personal altamente capacitado, insumos costosos y equipos especiales para lectura e interpretación de resultados. Los diagnósticos basados en anticuerpos actualmente tienen un auge que va en incremento y los convierte en opciones factibles como pruebas de tamizaje.

Los anticuerpos de dominio sencillo, por su termoestabilidad y fácil producción en huéspedes bacterianos se postulan como potenciales agentes para generar diagnósticos económicos. El primer trabajo publicado de la producción de anticuerpos monoclonales obtenidos de una biblioteca no inmune y utilizando la técnica de despliegue en fagos y expresado en procariotas (*E. coli*), el organismo utilizado fue un tiburón *Orectolobus maculatus* y los anticuerpos obtenidos tienen la capacidad de reconocer y neutralizar a la proteasa gingipaina secretada por el agente causal de la gingivitis estableciendo un antecedente de la versatilidad de la tecnología partiendo de bibliotecas inmunes y no inmunes [4].

En los elasmobranquios se pueden encontrar anticuerpos de tipo IgM e IgW [5]. En 1995, se describió un nuevo tipo de anticuerpos, al que denominaron IgNAR (nuevo receptor de antígeno), el cual carece de cadenas ligeras y toda la capacidad de reconocimiento se encuentra en los tres dominios variables de la cadena pesada principalmente en el CDR3 (región determinante de la complementariedad 3); contando con un peso molecular de alrededor de 95kDa comparándolo con 160kDa de una IgG humana. Dentro de las características propias del anticuerpo IgNAR están: su alta estabilidad después de la aplicación de calor (1 hora a 100º C) y su resistencia a la desnaturalización por urea (8M) [8].

El método propuesto se basa en la manipulación de anticuerpos con epítopos específicos de tuberculosis y VIH tipo 1, expresados en un modelo procariota, fijados en un sustrato solido de celulosa para analizar muestras de sangre periférica con un "smartphone" e interpretar los resultados mediante inteligencia artificial. En el ensayo doble ciego, los resultados mostraron una sensibilidad del 97% para TB y 98% para VIH tipo 1, valor predictivo de positivo 100% para ambos casos y valor predictivo de negativo de 89 y 92% respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modificación de un fragmento dominio sencillo-antígeno.

La construcción de las proteínas modificadas dominio sencillo-Tb y dominio sencillo-VIH, se partió de una proteína de tiburón y la extracción de muestras clínicas, amplificado y traslape de genes, lo cual se desarrolló anteriormente en el Laboratorio de Inmunología y Toxinas (actualmente Departamento de Innovación Biomédica) del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

El vector pComb3x, fue empleado para clonar la construcción, y expresarlo en forma soluble. Este vector les confiere resistencia a las bacterias transformadas para los antibióticos β-lactámicos, contiene sitios de restricción unidireccionales, la cual permite la clonación direccional de genes. Para la expresión de genes, este vector contiene el promotor *Lac* y la secuencia Shine-Delgarno, seguidas de la secuencia para el péptido señal de OmpA. El plásmido contiene una etiqueta para la purificación de la proteína expresada mediante cromatografía por afinidad a metales; además, contiene un epítopo de 9 aminoácidos de la hemoaglutinina del virus de la influenza, lo cual también ayuda en la detección de manera directa de las proteínas por medio de anticuerpos comerciales [10].

Transformación del dominio sencillo en vector procariota y expresión de proteína soluble

Partiendo de un plásmido aislado previamente ligado con fragmentos quiméricos, se tomaron 5 µg y se incubó en hielo por 1min, se mezcló con 300 µl de células TOP electrocompetentes, se incubaron por 2 min más y se vaciaron gentilmente en una cubeta de electroporación. La electroporación se llevó a cabo a 2.5kv 200Ω por 4ms, se lavó la cubeta con 1ml de medio SOC seguida de dos lavados con 2ml de medio SOC a temperatura ambiente, se combinaron con 5ml más de medio y se incubaron a 37°C 1hr a 250rpm. Se añadieron 10ml de medio SB precalentado a 37°C y 3 µl de ampicilina a 100mg/ml, se tomaron 10 µl y se sembraron en placa de LB agar con ampicilina 100ug/ml, dejando incubar toda la noche. De las colonias obtenidas se hizo PCR y se hizo electroforesis en gel de agarosa para evaluar cuales contenían el inserto. De un cultivo fresco de una colonia seleccionada se inoculó 1/100 en 6 ml de medio SB con MgCl 20mM y 6µl de ampicilina a 20ug/ml, incubándose a 37°C y 300rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 leída a 600nm. Para inducir la secreción de la proteína se agregaron 7.2ul de IPTG (0.5mM PROMEGA) y se dejó incubando con agitación a 30°C toda la noche

El cultivo obtenido en el paso anterior se centrifugó a 4,600rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue re suspendido en 2ml de PBS 1x, se pasó a un baño con agua caliente a 50°C por 7 minutos, seguida de congelación a -70°C por 7min, repitiendo el proceso por 7 ciclos más. El paquete celular nuevamente se centrifugó a 10,000rpm por 20 minutos para compactar el detritus celular, el sobrenadante se filtró empleando una membrana con un tamaño de poro de 0.2 µm y se colectó en un tubo estéril almacenándose a -20°C hasta su análisis posterior.

De la proteína obtenida se colocaron 50 µl por triplicado en una placa para ELISA con sus respectivos controles positivo y negativo también por triplicado.

Se incubó por 1 hr a 37°C, posteriormente se descartó el contenido y se bloquearon los pozos con BSA3 %-PBS 1x (albumina de suero bovino), incubando nuevamente 1 hr. Se lavaron los pozos con Tween 0.05%-PBS1x tres veces, se agregaron 50 µl de anticuerpo monoclonal de ratón (ROCHE) diluido en BSA 1 %-PBS1x incubándose 1 hr a 37 °C. Se lavó con Tween 0.05%-PBS1x tres veces y se añadieron 50 µl de sustrato para peroxidasa (ABTS 20 µg/ml, amortiguador de citratos 1x, peróxido de hidrogeno 0.3 %) se dejó reposar por 20 minutos sin estímulo luminoso y se leyó a 405 nm en un lector para placas de ELISA (BIORAD).

Fabricación de dispositivos y fijación en soporte solido de proteínas quiméricas

A partir de una plataforma de anticuerpos de dominio sencillo se realizaron construcciones a través de la fusión de dos antígenos de secreción temprana y un antígeno marcador de tuberculosis activa, y la proteína para VIH tipo 1. Las construcciones se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante cromatografía por afinidad a metales. La proteína purificada se fijó en la matriz solida de celulosa. Para el desarrollo del software de análisis se realizaron procesos de *machine learning* a partir de un total de 250 pruebas de sueros positivos a TB, a partir de lo cual se desarrolló un algoritmo de inteligencia artificial basado en redes neuronales el cuál fue programado en una aplicación en plataforma Android capaz de correr en un Smartphone. Una vez calibrado el software, se corrieron ensayos clínicos con sueros de pacientes (n=39) para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba comparándola con el diagnóstico obtenido por los estándares de referencia usados en los algoritmos aprobados para el diagnóstico de la enfermedad. Toda la información se almacenó en tiempo real en un servidor seguro en la nube. Una vez confirmado el reconocimiento *in vitro* de los anticuerpos hacia su epítopo, se procedió

a fijar la proteína purificada en un sustrato solido de celulosa a una concentración de 20 µg por sitio de prueba.

Al aplicar las muestras de los pacientes en la matriz, y posterior a 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se registraron visualmente diferencias visuales entre las muestras de sangre positivas y negativas, generadas por la integración del anticuerpo de dominio sencillo modificado y el biomarcador correspondiente. Posterior al análisis con el software de inteligencia artificial de nuestra prueba, los resultados mostraron una correlación directa con el estatus del estado de salud del paciente.

Con nuestro método diagnostico se analizó un primer cohorte de 39 pacientes en seguimiento de Tuberculosis y VIH. Los resultados se compararon con los diagnósticos oficiales de los pacientes y se calcularon los parámetros de precisión de la prueba

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó usando los siguientes criterios:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{(\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}) \times 100}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{(\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}) \times 100}$$

$$\text{Valor predictivo Positivo} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{(\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}) \times 100}$$

$$\text{Valor predictivo Negativo} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{(\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}) \times 100}$$

Para definir los verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos y falsos positivos se utilizará la siguiente tabla:

Tabla 1. Algoritmo de discernimiento de negativos y positivos reales.

DEFINICIONES DE VERDADEROS Y FALSOS NEGATIVOS Y POSITIVOS	
Verdaderos Positivos	Muestras con prueba experimental y cultivo positivos
Verdaderos Negativos	Muestras con prueba experimental y cultivo negativos
Falsos Positivos	Muestras con prueba experimental positiva y cultivo negativo
Falsos Negativos	Muestras con prueba experimental negativa y cultivo positivo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de fragmentos quiméricos

Para fusionar las proteínas recombinantes primero se aislaron y purificaron los genes codificantes para el anticuerpo de dominio sencillo y antígenos de TB de un gel de agarosa al 1 %. El PCR de traslapado empleo incremento gradual de temperatura, esto fue necesario para la amplificación del fragmento quimérico ya que los cebadores para los fragmentos de 320 y 290-300 pb tienen temperaturas de fusión diferentes. El fragmento obtenido fue de alrededor de 700 pb el cual correspondía con el tamaño

esperado esto debido a que los cebadores para el "overlap" poseen un sitio de dirigido de 40 pb que permitió la unión de la construcción quimérica. En la Figura 1 se muestra la imagen del gen quimérico, así como fragmentos de anti-eritrocitos y antígenos TB como control, debido a variaciones en las temperaturas de fusión.

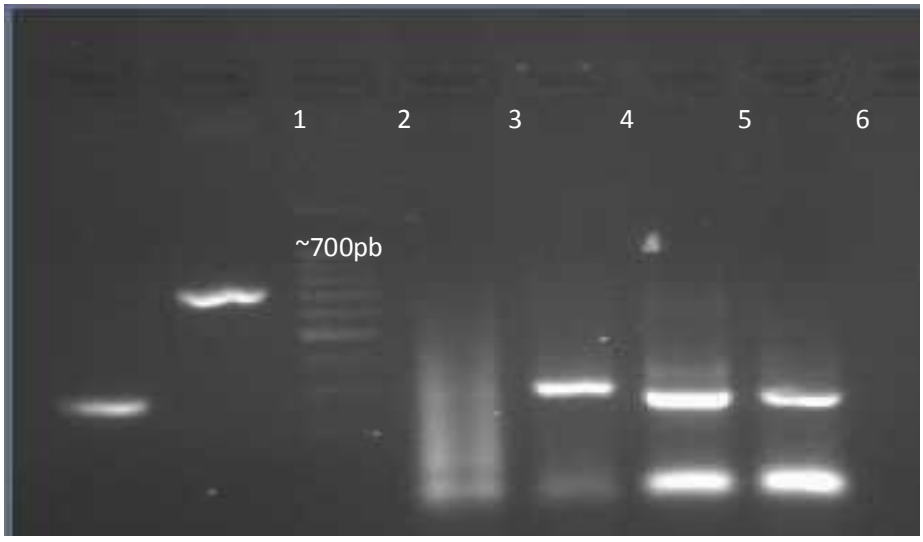


Fig. 1. Electroforesis de traslapado. Gel de agarosa al 2 %. Carril 1 Antígeno de TB, carril 2 construcción quimérica, carril 3 marcador de peso molecular, carril 4 sin amplificar, carril 5 anti eritrocitos, carril 6 y 7 resultados negativos de traslapado.

Se realizaron las pruebas experimentales de dominio sencillo en sustrato sólido en un ensayo doble ciego con 39 sueros de pacientes, en la Figura 2 se muestran las cruces del sustrato solido de celulosa donde se aplicó la sangre lavada y enriquecida con sueros problema, observando y analizando patrones de macro y micro aglutinación interpretadas con el software de análisis.

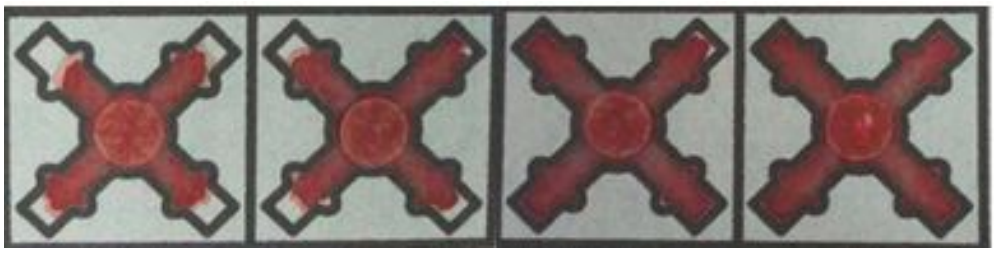


Fig. 2. Interacción dominio sencillo-biomarcador en matriz de celulosa. Imágenes a) y b) resultado positivo, c) resultado negativo, d) control negativo.

Los resultados de las pruebas experimentales se muestran en la Tabla I, en esta tabla se muestra el análisis estadístico de las pruebas, identificando valores de sensibilidad y especificidad de tamizaje de tuberculosis mayores a las pruebas actuales usadas por la Secretaria de Salud.

Tabla 2. Resultados de precisión de pruebas clínicas en la primera cohorte de pacientes.

	Cohorte 1 TB	Cohorte 1 HIV
Sensibilidad	97%	98%
Especificidad	100%	100%
Valor Predictivo Positivo	100%	100%
Valor Predictivo Negativo	89%	92%

Tomando en cuenta el tiempo que se llevó montar el ensayo aún con el lavado de eritrocitos y la obtención del resultado, podemos sugerir que la metodología propuesta para el diagnóstico de tuberculosis humana es una opción para sustituir las baciloscopias seriadas, aun montando la técnica como se muestra en el presente documento.

CONCLUSIONES

Con el uso de esta tecnología y los tres epítopos utilizados para la detección de tuberculosis se logró determinar la presencia de infecciones, con un alto nivel de sensibilidad y especificidad, superiores a las pruebas actuales de diagnóstico *in situ*, además de mostrar la posibilidad de diferenciar entre casos activos y latentes. La determinación de pacientes con VIH demostró la misma eficiencia que las pruebas rápidas actuales. Por lo tanto, esta tecnología demuestra un alto potencial como la herramienta ideal para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica en tiempo real de enfermedades infecciosas.

REFERENCIAS

[1] World Health Organization WHO Tuberculosis Diagnostics Workshop: Product Development Guidelines, 1–27, 2007. Cleveland, OH: WHO, 1997.

[2] Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.

[3] Pollock, J. M., and P. Andersen. 1997. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. J. Infect. Dis.Vol. 5 pp. 2587-2592.

[4] Cockle P., Gordon S., Lalvani A., Buddle B., Hewinson R., Vordermeier1 H. 2002. Identification of Novel *Mycobacterium tuberculosis* Antigens with Potential as Diagnostic Reagents or Subunit Vaccine Candidates by Comparative Genomics. Infection and Immunity. 70 (12): 6996–7003.

[5] Lalvani A., Pathan A., Mc Shane H., Wilkinson R., Latif M., Conlon C., Pasvol G., Hill A.2001. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Enumeration of Antigen-specific T Cells Am J Respir Crit Care Med. 163:pp 824–828.

[6] Drobniewski F., Caws M., Gibson A, Young D. 2003. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. The Lancet Infectious Diseases. 3: 141-147.

[7] Weldingh K., Rosenkrands I., Okkels L, Doherty T., Andersen P. 2005. Assessing the Serodiagnostic Potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* Proteins and Identification of Four Novel Serological Antigens Journal Of Clinical Microbiology, 43 (1): 57-65.

[8] Abbas A., Lichtman A., Pober. 2002. Inmunología Celular y Molecular. 4th edition. McGraw-Hill España 552 pp.

[9] Holliger P., Hudson P. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology. 23(9): 1126-1136 p.

[10] Fauci A., Braunwald E. Isselbacher K. Wilson J., Martin J. Kasper D., Hauser S., Longo D. 2004, Principos de Medicina Interna de Harrison. 15a. edición. McGraw-Hill. España.

[11] Nuttall S., Irving R., Hudson P. 2000. Immunoglobulin VH domains and beyond: desing and selection of single-domain binding and targeting reagents. Current Pharmaceutical Biotechnology. 1(3): 253-263 p.

[12] Streltsov V., Varghese J., Carmichael J., Irving R., Hudson P., Nuttall S. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from cell-surface receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences. 101(34): 12444-12449 p.

[13] Greenberg A., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E., Flajnik M. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversifications in sharks. Nature. 374(6518): 168-173 p.

[14] Tanfield R., Dooley H., Flajnik M., Wilson I. 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody with lysozyme. Science. 304(5691): 1770-1773 p.

[15] Camacho V. T. A. (2007). Obtención de fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo tipo VHNAR del tiburón *Heterodontus francisci* neutralizantes de las citocinas TNF-α y $VEGF_{165}$. Tesis de maestría en ciencias. (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada).

[17] Barbas C. Burton D., Scott J., Silverman. 2001 Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 345pp.

[18] Gonzalez Buitrago M. La clínica y el laboratorio: interpretación de análisis y pruebas funcionales 19ª edición. Ed. Masson, 2004.

ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD Y CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE UN ANTICUERPO DE DOMINIO SENCILLO CON USO TERAPEUTICO POTENCIAL.

[1]García-García, O.L., [2]Licea-Navarro, A., [3]Vallejo-Cardona, A.A., [3*]Camacho-Villegas, T. A.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jalisco, México.
2. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Departamento de Innovación Biomédica, Carretera Ensenada-Tijuana, 3918, Zona Playitas, CP 22860, Ensenada, BC, México.
3. CONACYT- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: tcamacho@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
Estudios basados en el repertorio inmune de los elasmobranquios ha permitido el aislamiento de dominios variables vNAR (12-15 kDa). Se ha demostrado que estos dominios están naturalmente diseñados y adaptados para ajustarse a las exigencias en la generación de nuevos productos biotecnológicos, superando las limitaciones de los Ab monoclonales (mAb) como la especificidad para neutralizar antígenos terapéuticamente relevantes y la estabilidad en diversas condiciones fisicoquímicas. En este proyecto, se evaluó la estabilidad del anticuerpo vNAR considerando diversos valores de pH (5.5, 7.4 y 8.5), temperatura (4, 37 y 50 °C), tiempos de incubación (24, 72 y 168 h), así como el mantenimiento de su capacidad de reconocimiento molecular al antígeno. En este caso, el antígeno está implicado en procesos patológicos como cáncer. Por otra parte, se empleó la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la fluorometría de laurdan para caracterizar y confirmar la estabilidad del anticuerpo vNAR, demostrando la versatilidad que tienen estos dominios para ser empleados en aplicaciones biotecnológicas de terapia y diagnóstico.

Palabras clave: Anticuerpos; Proteínas; vNAR, estabilidad.

INTRODUCCIÓN

Las ventajas que ofrece la biotecnología para producir anticuerpos (Ab) expresados como proteínas recombinantes evidentemente ha traído varios beneficios en la salud humana. Los Ab se han convertido en uno de los principales impulsores de la industria biofarmacéutica, dado que han demostrado eficacia contra el tratamiento de cáncer, en el control de enfermedades infecciosas y otras enfermedades humanas. Además, dentro de este sector, los anticuerpos terapéuticos son las moléculas biotecnológicas de mayor éxito con ingresos superiores a 150 mil millones de dólares [1]. Actualmente, las pruebas de diagnóstico en el mercado que emplean como base los anticuerpos monoclonales (mAb) son principalmente de origen murino, presentando desventajas como poca especificidad para reconocer a su antígeno, una consecuencia de la inestabilidad en su estructura, ya que éstas pruebas tienden a ser

requeridas en zonas donde no se cuenta con equipos eficientes para su conservación y transporte en cadena de frío. Dado que uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica es el desarrollo de diagnósticos rápidos, precisos y de bajo costo con la finalidad de reducir los índices de morbilidad y mortalidad causados por diversas enfermedades en nuestro país, es de vital importancia la generación de pruebas de diagnóstico que sean fáciles de utilizar y lo suficientemente robustas para sobrevivir a la exposición en condiciones extremas de temperatura y humedad.

Durante los últimos 20 años, diversos estudios basados en la clase de inmunoglobulina denominada Nuevo Receptor de Antígeno (IgNAR) del repertorio inmune de los elasmobranquios, donde la unión al antígeno está determinada por un dominio variable denominado vNAR (~12 - 15 kDa), han demostrado que potencialmente pueden superar las limitaciones de los mAb para neutralizar al antígeno [2], con una gama de propiedades adicionales como: 1) Especificidad y alta afinidad por el antígeno, 2) Su tamaño le da una alta permeabilidad a tejidos a los que un Ab tradicional no tiene acceso, 3) Alta estabilidad biofísica, siendo capaz de recuperar su estructura nativa fácilmente después de ser calentado a más de 90 ˚C, dando la confianza de almacenarlos por periodos prolongados y transportarlos a lugares donde la refrigeración no es factible [3].

Una de las principales prioridades de la biotecnología farmacéutica es la obtención de moléculas estables es decir, moléculas resistentes a los efectos de la temperatura, a los agentes caotrópicos, a los solventes orgánicos, a los detergentes para prevenir su inactivación biológica por cualquier agente externo, asunto al que se le dedican esfuerzos considerables en la investigación [4].

La técnica de calorimetría de barrido es una de las técnicas eficientes para el estudio de la estabilidad de moléculas biológicas, debido a que proporciona información acerca de los parámetros termodinámicos de estabilidad de la estructura macromolecular. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una herramienta poderosa para caracterizar los cambios de estado o de conformación inducidos por un cambio en la temperatura sobre las moléculas orgánicas e inorgánicas, por lo que actualmente se ha empleado en estudios de predicción del mecanismo de plegamiento de las proteínas y su predicción en su estabilidad presente durante el cambio conformacional.

Por otro lado, en los últimos años, la aplicación de la fluorescencia en microscopía ha facilitado una nueva forma de observar muestras biológicas, estructuras e interacciones. Laurdan (6-lauroil-2 dimetilamino naftaleno) ha sido ampliamente utilizado para monitorear interfaces debido a sus propiedades solvatocrómicas, ya que el Laurdan se inserta en la zona hidrofóbica de las moléculas y es capaz de sensar la interfase o también llamada, zona de contacto; en este caso, entre la zona hidrófoba de la molécula y su interacción del agua. El Laurdan muestra un notable aumento de su momento dipolar en el estado excitado, dependiendo del medio en el que se encuentra y de la interacción con la interfase acuosa. Si existe este aumento se puede conducir a un desplazamiento significativo del espectro de emisión de fluorescencia [5]. Este cambio se puede medir por medio del parámetro de Polarización Generalizada (GP). El espectro GP da una indicación del estado físico de una estructura incluyendo la coexistencia de fase, es decir representa adecuadamente los cambios de fase en un rango de temperatura de transición desde el gel al estado líquido cristalino [6].

El objetivo de este trabajo, fue demostrar el potencial de un anticuerpo vNAR partiendo desde su obtención como proteína recombinante. Para lo cual, se produjo en lote un anticuerpo de dominio

sencillo (vNAR), a partir de una clona de *E. coli* con el plásmido pACR2.1 codificante del anticuerpo. Se realizaron experimentos para evaluar su estabilidad [7] considerando diversos valores de pH, temperatura y tiempos de incubación mediante un Dot-blot. Además, se realizó un experimento de termoestabilidad empleando la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la técnica de fluorescencia, con la finalidad de confirmar los atributos de los anticuerpos vNAR de mantener su función biológica aún en condiciones adversas. Así mismo, se evaluó su capacidad de reconocimiento molecular a una citocina que participa en condiciones patológicas por ejemplo, en condiciones de hipoxia dando lugar al crecimiento de tumores sólidos [8]. Por lo anterior, varias estrategias se han probado para desarrollar moléculas neutralizantes como opciones terapéuticas contra el cáncer. Nuestros resultados demuestran el potencial de los dominios de anticuerpo vNAR derivados de tiburón para generar nuevos productos biotecnológicos que impacten en el tratamiento de enfermedades humanas graves, ofreciendo ventajas sobre las plataformas de Ab clásicos [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción y extracción de proteína vNAR

Se realizó la transformación de las bacterias electrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con el plásmido pACR 2.1 conteniendo el fragmento codificante para el anticuerpo de dominio vNAR. Las células fueron cultivadas en medio TB (más 50 µg/mL de ampicilina y 35 µg/mL de cloranfenicol), realizando la inducción con 1mM de IPTG a una densidad óptica entre 0.5 y 0.7 a 600 nm. Finalmente, el paquete celular se obtuvo mediante centrifugación y se almacenó a -20 °C para la posterior extracción de proteína. La fracción soluble (denominada Proteína Nativa) se obtuvo bajo el método de choque osmótico. Se resuspendió el paquete celular obtenido de la inducción en buffer PPB (30 mM Tris-HCl, 20% sacarosa, pH.8.0) manteniéndola en frío y agitación lenta por 20 minutos, mientras se agregaba EDTA gota a gota hasta una concentración final de 1 mM. Se centrifugó y el sobrenadante se almacenó a -20 °C. El paquete celular obtenido del paso anterior se resuspendió en 5 mM $MgSO_4$ repitiendo los pasos anteriormente mencionados, pero sin agregar EDTA. Finalmente, el flujo de choque osmótico de $MgSO_4$ que contiene la proteína de interés se recuperó por centrifugación para su posterior análisis. Por otro lado, la extracción en condiciones desnaturalizantes se realizó bajo el protocolo de QIAGEN, manual "The QIAexpressionist: a handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins". El paquete celular se mantuvo en hielo y se resuspendió en un buffer B con pH 8.0 (NaH_2PO_4/Tris-Cl/Urea), se lisaron las células agitando la mezcla durante 60 min a temperatura ambiente. Finalmente, el sobrenadante conteniendo las proteínas de interés se obtuvo mediante una centrifugación a 5,000 rpm a temperatura ambiente.

Purificación de la proteína vNAR empleando cromatografía de afinidad a metales pesados

La solución de la extracción periplasmática (sobrenadante de $MgSO_4$) que contenía la proteína vNAR obtenida por choque osmótico, se ajustó a pH 8.0 y se agregó imidazol hasta una concentración final de 20 mM. Se pasó 3 veces el volumen total de la extracción a través de la columna con resina Ni-NTA (previamente homogenizada y equilibrada). Se hizo un lavado de la resina con buffer conteniendo 50 mM de imidazol y se realizaron 5 eluciones con buffer de 250 mM de imidazol. De la misma manera, se realizó la purificación de las proteínas extraídas en condiciones desnaturalizantes, se añadió 1 mL de la resina de Ni –NTA a 4 mL de lisado, se mezcló suavemente y se cargó la mezcla en una columna de purificación vacía. Después, se pasó el volumen total de la extracción y finalmente se realizaron 4 eluciones de la proteína con buffer D (100 mM NaH_2PO_4, 1 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 5.9) y con buffer E

(100 mM NaH_2PO_4, 1 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 4.5) respectivamente y se almacenaron hasta su análisis congelando a -20 °C.

Plegamiento de la proteína vNAR desnaturalizada

La proteína obtenida en condiciones desnaturalizantes, se cuantificó, dializó y concentró. Para el plegamiento, se diluyó hasta alcanzar una concentración final de 50 µg/mL en el buffer de plegado (50 mM Tris-HCl pH. 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM GSH, 0.4 mM GSSG). Se agitó levemente por 1 hora y se incubó a temperatura ambiente durante 16 h. Finalmente, la proteína se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

SDS-PAGE de proteína nativa, desnaturalizada y plegada

Se preparó un gel desnaturalizante de poliacrilamida con buffer de glicina, con una concentración del 12%, para visualizar la proteína purificada obtenida en diferentes condiciones de extracción y purificación.

Las muestras de proteína vNAR purificada Nativa (N) y Plegada (P) se prepararon mediante una precipitación con TCA 100% frío, incubando por 16 horas a 4 °C seguido de una desnaturalización final a 95 °C en presencia de SDS y β-mercaptoetanol. A la proteína Desnaturalizada (D), se le agregó buffer de carga y se procedió a cargar el SDS-PAGE realizado conforme a lo descrito anteriormente.

Cuantificación de las proteínas vNAR por el método Bradford

Para conocer la concentración de la proteína vNAR, se realizó una curva de calibración empleando BSA (albumina de suero bovino) como solución testigo y con concentraciones conocidas. En una placa de ELISA de 96 pozos, se agregaron 150 µL por triplicado de cada una de las concentraciones de BSA, así como de cada muestra de proteína nativa (N), desnaturalizada (D) y plegada (P) con concentración desconocida. Como control negativo se incluyó buffer TBS 1X. Después, a cada pozo se le agregaron 200 µL de reactivo de trabajo preparado de acuerdo a las condiciones del fabricante "Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit" y se agitó durante 30 segundos. Se dejó la placa en incubación durante 30 min a 37 °C y 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 562 nm. Los datos obtenidos de las muestras de la proteína extraída por diversos métodos y posteriormente purificada, se interpolaron en dicha curva de calibración para determinar su concentración en mg/mL.

Análisis de termoestabilidad y estabilidad a pH del anticuerpo vNAR

De las muestras purificadas de proteína nativa (N), desnaturalizada (D) y plegada (P), se prepararon 27 alicuotas de cada una, con tres diferentes condiciones de pH (9 muestras por cada una de las condiciones analizadas). En total, se obtuvieron 81 muestras para todos los tratamientos, 3 controles positivos que fueron almacenados a -20 °C y como control negativo se incluyó la cepa de *E.coli* BL21(DE3) pLys sin transformar (sin plásmido codificante de vNAR). Se incubaron las muestras durante 24 h, 72 h y 168 h a tres condiciones de temperatura las cuales fueron: 4 °C, 37 °C y 50 °C, así como tres condiciones de pH de 5.5, 7.4 y 8.5.

Las muestras control fueron almacenadas a -20 °C. Una vez cumpliendo el tiempo de incubación de cada muestra, se fue retirando y almacenando a -20 °C hasta su análisis. Finalmente, se procedió a realizar un ensayo de Dot blot, empleando el equipo Biodot (BIORAD). Para lo cual, se hidrató la membrana de nitrocelulosa con buffer TBS 1X y después se cargaron las alicuotas tratadas con diferentes tiempo de incubación, diferente temperatura y pH de 5.5. Enseguida, la membrana se colocó en solución de

bloqueo (leche descremada 5%-TBS1X) y se dejó a 37 °C durante 5 horas. Pasado este tiempo, se agregó el anticuerpo anti-His acoplado a peroxidasa diluido 1:1,000 en 3% leche descremada–TBS 1X y se incubó a 37 °C durante 16 horas. Finalmente, la membrana se reveló con sustrato HRP. De la misma forma se repitió el protocolo para las muestras tratadas a pH de 7.4 y 8.5.

Análisis de la capacidad de reconocimiento del antígeno por el anticuerpo vNAR

Para determinar la capacidad de reconocimiento del anticuerpo vNAR obtenido en diferentes condiciones de extracción, purificación y después de haber sido sometido a diferentes condiciones de temperatura y pH, se realizó un Dot-blot de reconocimiento al antígeno. Empleando el equipo de Biodot, en una membrana de nitrocelulosa se fijaron 500 ng de la citocina usada como antígeno. Después, se fijó el anticuerpo vNAR purificado en las diferentes condiciones y se nombraron 1) proteína Nativa (N), 2) proteína Desnaturalizada (D), 3) proteína Plegada (P). Como control positivo, se agregó una proteína diferente al vNAR pero que cuenta con la etiqueta de seis histidinas y como control negativo, se empleó TBS 1X. Posteriormente, se añadió el anticuerpo anti-His, diluido 1:1,000 en 3% leche descremada-TBS 1X y se incubó durante 16 h a 4 °C. Después, se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón-peroxidasa diluido 1:1,500 en TBS 1X y finalmente se agregó el sustrato HRP para revelar la membrana.

Una vez realizados los análisis moleculares de la termoestabilidad y de reconocimiento, se procedió a comprobar estos resultados a través del análisis termodinámico de las moléculas de vNAR y la citocina empleada como antígeno en este proyecto, así como de su unión mediante esta técnica de Fluorometría y su posterior análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Cambios conformacionales y estabilidad detectada por Calorimetría Diferencial de Barrido

Se colocaron 5 µL de proteína vNAR unida al antígeno (citocina) a una relación molar 10:1 (vNAR:citocina) más etilenglicol al 13%. Esta mezcla se colocó en celdas de aluminio (T170228, TA Instruments), cubiertas con una tapa de aluminio y sellada por prensado. Las celdas de referencia se prepararon de manera similar, pero sin ninguna muestra. La exploración de calentamiento se realizó desde -20 °C hasta 115 °C con incrementos de temperatura de 10 °C/min empleando el equipo Q2000 (TA Instruments).

Cambios conformacionales detectados por fluorescencia

Se marcaron con Laurdan muestras del anticuerpo vNAR unido a citocina para probar la estabilidad de la unión. La reacción se preparó agregando 0.035 µM de Laurdan para 1 mM de proteína vNAR purificada. Todas las muestras fueron incubadas en agitación cubiertas de la luz por 16 horas, después se añadió 0.35 µL de citocina (10 µM, concentración inicial), se agito 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron evaluadas como se muestran en la Tabla I y se colocaron en pozos independientes de una placa negra de 96 pozos. Después de esto, las muestras fueron incubadas dentro del fluorómetro (Cytation 5, Bioteck). Se obtuvieron los espectros de GP de excitación (evaluados a 325 nm y 390 nm) y los espectros GP de emisión (evaluados 440 a 490 nm), realizando lecturas cada 2 nm para ambos casos. Las temperaturas evaluadas fueron de 25, 35 y 45, 70 , 100 y 120 °C. Las 3 primeras temperaturas se alcanzaron con el equipo y las 3 temperaturas posteriores fueron alcanzadas usando una placa de calentamiento.

El valor de los espectros de polarización generalizada de Laurdan (GP) se calcularon de acuerdo a las siguientes ecuaciones: Gpλem= (I390- I325) /(I390+ I325) para el espectro de emisión y para el espectro de excitación Gpλex= (I440- I490)/(I440+ I490). GPemS y GPexS se calculó con las ecuaciones: GPexcS= (GPexc410 – GPexc 340)/(410-340) para el espectro de emisión. GPexcS= (GPexc410 – GPexc 340)/(410-340) para el espectro de emisión [10].

Tabla I. Muestras evaluadas mediante fluorometría de Laurdan

Muestras			Control	
vNAR + Laurdan	Citocina + Laurdan	vNAR + Citocina + Laurdan	PBS 1X	DMSO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SDS – PAGE de proteina Nativa, Desnaturalizada y Plegada

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, con la finalidad de comparar las diferentes estrategias de purificacion de la proteína vNAR obtenida al emplear diferentes metodos de extracción. En la Figura 1, se presenta el resultado de este análisis. La estructura tridimensional de una proteína en condiciones fisiológicas se conoce como estructura nativa y se considera la estructura más estable. Además, la estructura nativa suele ser funcionalmente activa. Sin embargo, al cambiar las condiciones ambientales, la estructura nativa se pierde y se obtiene la desnaturalización de la proteína producto de 1) incremento de la temperatura, 2) cambios drásticos de pH, 3) acción de agentes caotrópicos como la urea o cloruro de guanidinio. Lo anterior conduce a la pérdida de la estrutura secundaria y terciaria de la proteína. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la proteína vNAR puede ser extraída y purificada con el peso molecular adecuado (15 kDa) independientemente de su método de obtención.

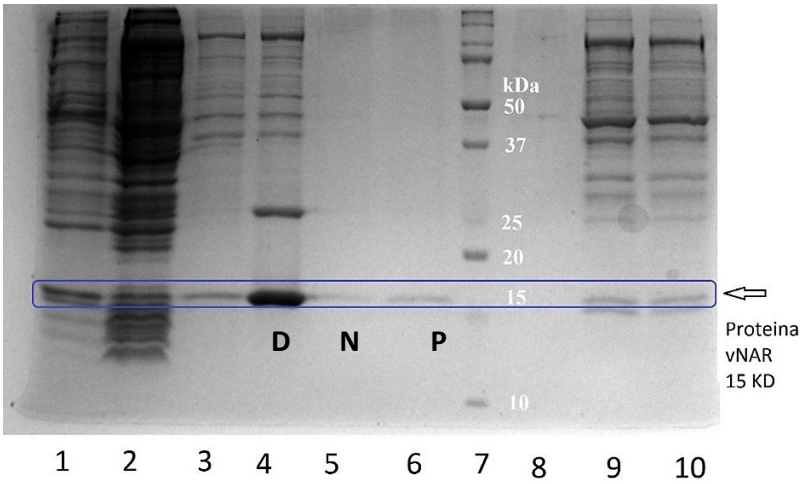


Figura 1. SDS- PAGE Glicina 12% comparativo de purificación de proteína vNAR en su forma nativa (N), desnaturalizada (D) y replegada (P). Carril 1: extracto después de pasar por la columna. Carriles 2 y 3: Primer lavado con buffer 20 mM de imidazol y lavado con buffer 50 mM respectivamente.Carril 4: proteina en condiciones desnaturalizantes. Carril 5: Corresponde a la proteina nativa purificada. Carril 6: proteína replegada. Carril 8: solución restante del lavado con buffer E, en la cual no se observa pérdida del anticuerpo vNAR. Carriles 9 y 10: eluciones con el buffer D de proteína vNAR desnaturalizada, esta proteína fue empleada como control en este gel.

Cuantificación de proteina vNAR por el metodo Bradford

En la cuantificacion de la proteína vNAR en su forma soluble, desnaturalizada y plegada mediante se obtuvieron las concentraciones que se muestran en la Tabla II, con un valor de correlacion de R^2= 0.9829.

Tabla II. Cuantificación de proteína vNAR

Proteina vNAR	Concentración
Soluble (N)	0.3713 mg/mL
Desnaturalizada (D)	0.9533 mg/mL
Plegada (P)	0.169 mg/mL

El plegamiento del anticuerpo se realizó a partir de una alicuota de proteína desnaturalizada (D) (extraída con 8 M de urea) con concentración de 0.2675 mg/mL con la cual se obtuvo la proteina plegada (P) con una concentración de 0.169 mg/mL con un rendimiento final del 63.17% de plegamiento. El resultado obtenido en nuestro trabajo es mejor en un 30% respecto al rendimiento de replegado reportado en [11], empleando el mismo metodo de dilución y buffer de plegado.

Análisis de termoestabilidad y estabilidad a pH de la proteína vNAR

En este trabajo, se observó que después de 1 día de incubación de la proteína nativa a 4 °C, 37 °C o 50 °C, se mantiene la estabilidad del anticuerpo vNAR cuando se encuentra en un pH de 5.5; mientras que la estabilidad de la proteína se redujo al pH de 7.4 y de 8.5 (Figura 2). Después de 3 días de incubación a 4 °C, 37 °C y 50 °C, se observó una mayor estabilidad de la proteína nativa en pH de 5.5 en comparación con un pH de 7.4. De la misma manera, la actividad disminuyó después de 168 h de incubación bajo estas mismas condiciones en un pH mayor a 7.4. Para la proteína extraída y purificada en condiciones desnaturalizantes (D), después de 1 día de incubación a 4 °C, 37 °C y 50 °C, se observó la retención de estabilidad en los tres rangos de pH analizados. Tras 3 días de incubación, de los tres rangos de pH evaluados, el análisis mostró una mayor estabilidad en pH de 5.5 y 8.5. Después de 168 h de incubación a 4 °C, la estabilidad de la proteína a pH de 5.5 en comparación con los otros valores mostró una intensidad de banda estable. Finalmente, el análisis de la proteína tratada para obtener su forma plegada (P), mostró que después de 1 día de incubación a 4 °C, 37 °C y 50 °C, se mantiene estable a pH de 5.5. La actividad disminuyó en valores de pH de 7.4. Pasado las 72 y 168 horas de incubación en las mismas condiciones, la estabilidad de la proteína fue mayor en pH de 5.5.

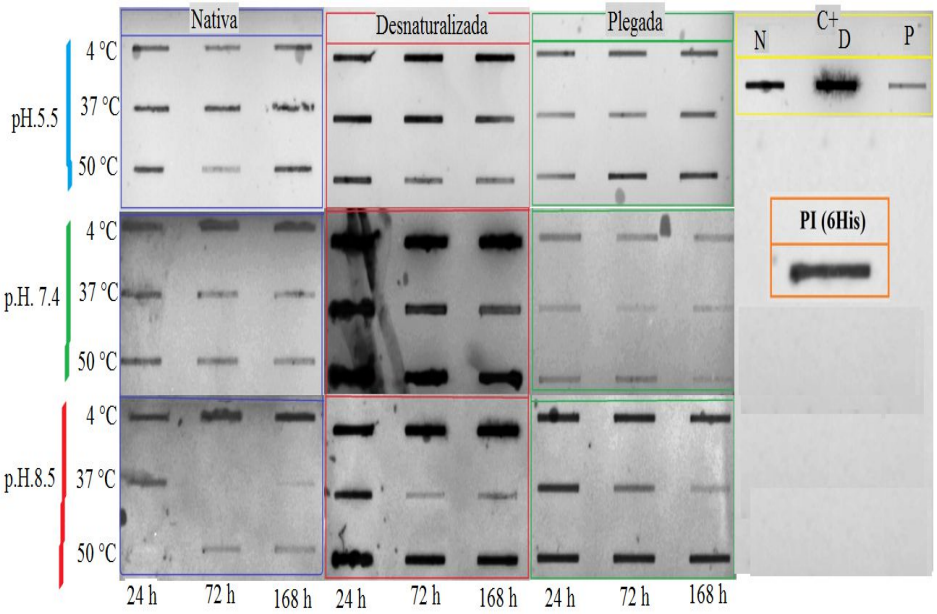


Figura 2. Dot-blot para analizar la estabilidad del anticuerpo vNAR. Después de ser incubado a diferentes temperaturas (4 °C, 37 °C y 50 °C), condiciones de pH (5.5; 7.4 y 8.5) y tiempos de incubación (24 h, 72 h y 168 h) la proteína vNAR (nativa (N), desnaturalizada (D), proteína plegada (P)) fue colocada en los mismos volúmenes y cantidades en una membrana de nitrocelulosa empleando el equipo BioDot. Para el reconocimiento de la etiqueta se empleó un anticuerpo anti-His de ratón. Para realizar el revelado, del control positivo se empleó un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (HRP).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Griffiths y colaboradores [5], donde demostraron que los VNAR´s exhiben propiedades de estabilidad térmica y una afinidad de unión en el rango nM-pM. El hallazgo demuestra que el replegado de la estructura de la proteína VNAR tras haber sido sometida a pH extremo, ciclos de calentamiento y enfriamiento durante períodos prolongados, lleva a la pérdida paulatina de actividad de la proteína, lo cual se debe al daño en su estructura, por ejemplo en la reducción del enlace disulfuro o la pérdida de la estructura que conforma el CDR3. Al analizar los resultados obtenidos en este proyecto, en algunos casos existió una reducción de la estabilidad del vNAR después de los tiempos de incubación y pH básico (pH de 8.5). Sin embargo, hay que mencionar que no se realizaron ciclos repetidos de cambios de temperatura, por lo tanto la estabilidad no ve se afectada al punto de una completa desnaturalización del vNAR.

Análisis de reconocimiento molecular al antígeno del anticuerpo vNAR.

El anticuerpo vNAR obtenido como proteína recombinante en diferentes condiciones de extracción y purificación 1) proteína soluble (N), 2) proteína desnaturalizada (D) y 3) proteína plegada (P) mantiene su capacidad de reconocimiento molecular cuando está en contacto con 500 ng de la citocina, aún después de haber sometido el vNAR a altas temperaturas (4, 37 y 50 °C) y valores de pH (4.5, 7.4 y 8.5).

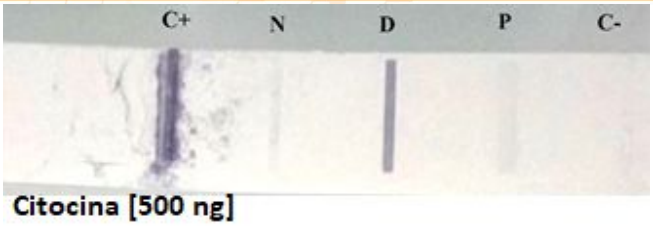


Figura 3.- Ensayo de reconocimiento de la citocina empleada como antígeno por el anticuerpo vNAR purificado. Se observa el efecto de reconocimiento del anticuerpo vNAR cuando se utilizan las tres formas de proteína purificada que fueron denominadas, Nativa (N), Desnaturalizada (D) y Plegada (P). Como Control positivo (C+) del Dot blot se incluyó una proteína irrelevante, pero con etiqueta de 6His y como Control negativo (C-) se utilizó buffer TBS 1X.

La capacidad del vNAR de recuperar su conformación nativa aun después de la exposición a temperaturas elevadas, sin perder su función de unión y reconocimiento molecular se atribuye a la disposición estérica de estos anticuerpos vNAR, que les permite localizar los tejidos diana de manera rápida y eficiente, mejorando la posibilidad de acceder a antígenos aún después de haber sido sometidos a condiciones extremas, características que los anticuerpos convencionales no han demostrado [1]. En otra investigación, Kovaleva y colaboradores, reportaron que la estructura del CDR3 combinado con el apoyo de un enlace disulfuro intermolecular, hace que los vNARs formen estructuras más compactas con paratopos inusuales, dicha propiedad también se le atribuye a su tamaño de ~15 kDa [3].

Cambios conformacionales y estabilidad detectada por Calorimetría Diferencial de Barrido

Se incluyó buffer PBS 1X como control del ensayo. El termograma de la citocina muestra una clara transición a la temperatura de 1 °C mientras que el vNAR presenta una transición aproximadamente a la temperatura de -3°C y otras dos transiciones endotérmicas menos pronunciadas. Estas transiciones se pierden cuando se encuentra unido el anticuerpo con el antígeno. Por la naturaleza de las celdas, no fue posible observar si la transición se mueve a temperaturas más altas o más bajas del rango analizado que incluye de -20 a 110 °C. Debido a esta limitación, se decidió analizar si dichas transiciones ocurrían a mayor temperatura empleando espectrometría de fluorescencia.

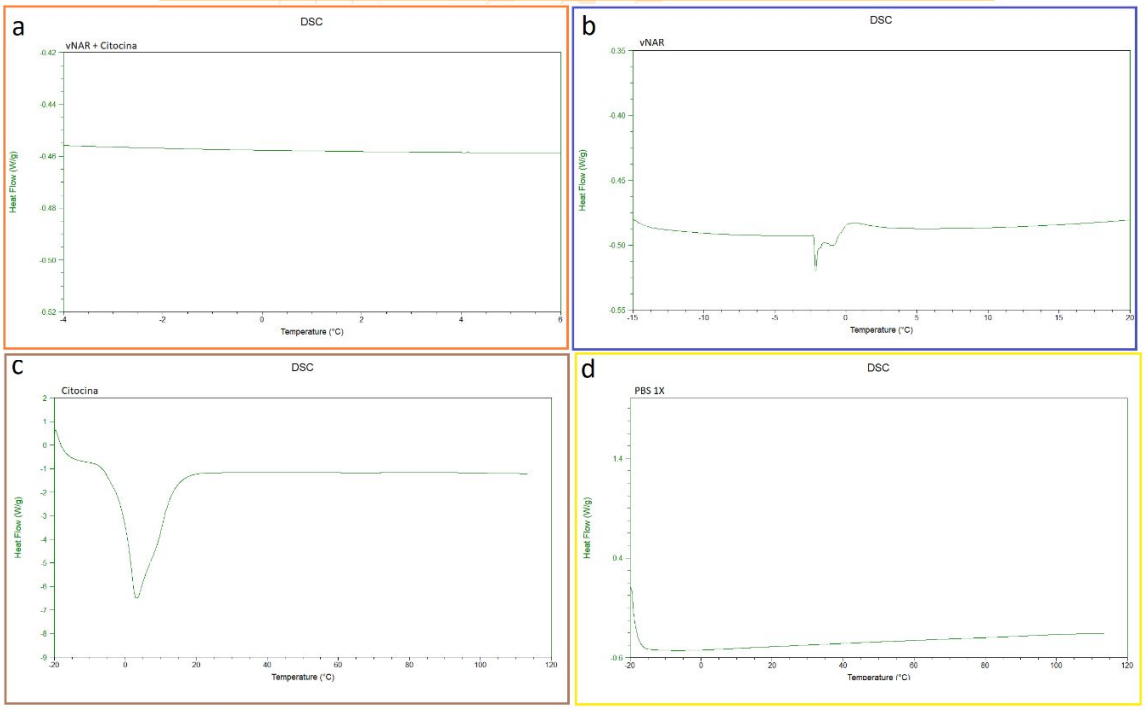


Fig. 4. Termograma de calorimetría diferencial de barrido. Se muestra la fase de transición endotérmica en el proceso de calentamiento de -20 °C hasta 115 °C para todas las muestras evaluadas. a) anticuerpo vNAR unido a la citocina, b) vNAR, c) citocina, d) PBS 1X fue empleado como control del ensayo. Estos datos calorimétricos proporcionan una fuerte evidencia de la presencia de un estado estable en la unión del anticuerpo vNAR + citocina al no presentar un cambio en el termograma.

Cambios conformacionales detectados por fluorescencia

Se muestran los espectros de fluorescencia del vNAR unido a la citocina y marcada con el Laurdan, donde se observa que los espectros de emisión no sufren aparentemente ningún corrimiento (Figura 5), así como los espectros de excitación, lo que se comprueba con los valores obtenidos de GP a lo largo de las diferentes longitud de onda. La intensidad de los espectros disminuye en algunos casos, quizá debido al incremento de la temperatura sin embargo, se muestra un espectro casi homogéneo, lo cual puede atribuirse a la unión de ambas moléculas que favorece la estabilidad independientemente de la temperatura.

En el espectro GPem (Figura 6), los valores de la pendiente son positivos y casi constantes a lo largo de toda la gama de temperaturas estudiadas, lo que significa que el sistema está en estado líquido cristalino. En cuanto a GPexS, la pendiente es negativa y también casi invariable a lo largo de toda la gama de temperaturas estudiadas. Estos resultados confirman la naturaleza cristalina líquida del sistema dentro del rango de temperaturas utilizada en el experimento.

Por los resultados obtenidos en los espectros de fluorescencia de la unión de vNAR y la citocina, se puede inferir estabilidad en la estructura del anticuerpo, debido a que la interacción del Laurdan con el medio acuoso permanece casi integra en todas las estructuras. Este resultado se mantiene en las diferentes temperaturas evaluadas.

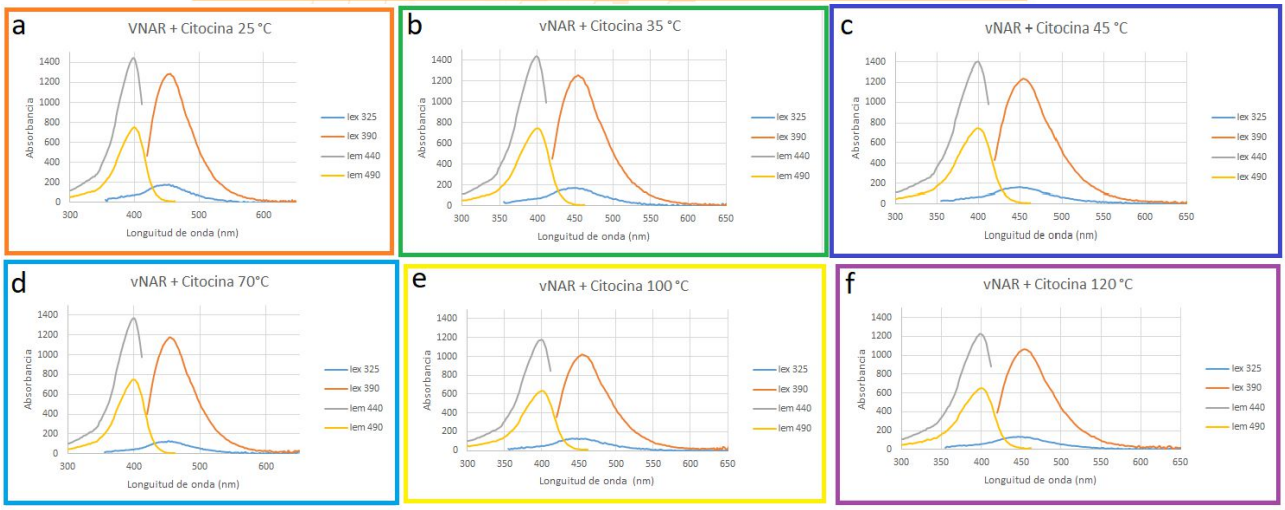


Figura 5. Espectros de emisión y excitación de la unión de vNAR + citocina a diferentes temperaturas a) 25 °C, b) 35 °C, c) 45 °C, d) 70 °C, e) 100°C y f) 120 °C.

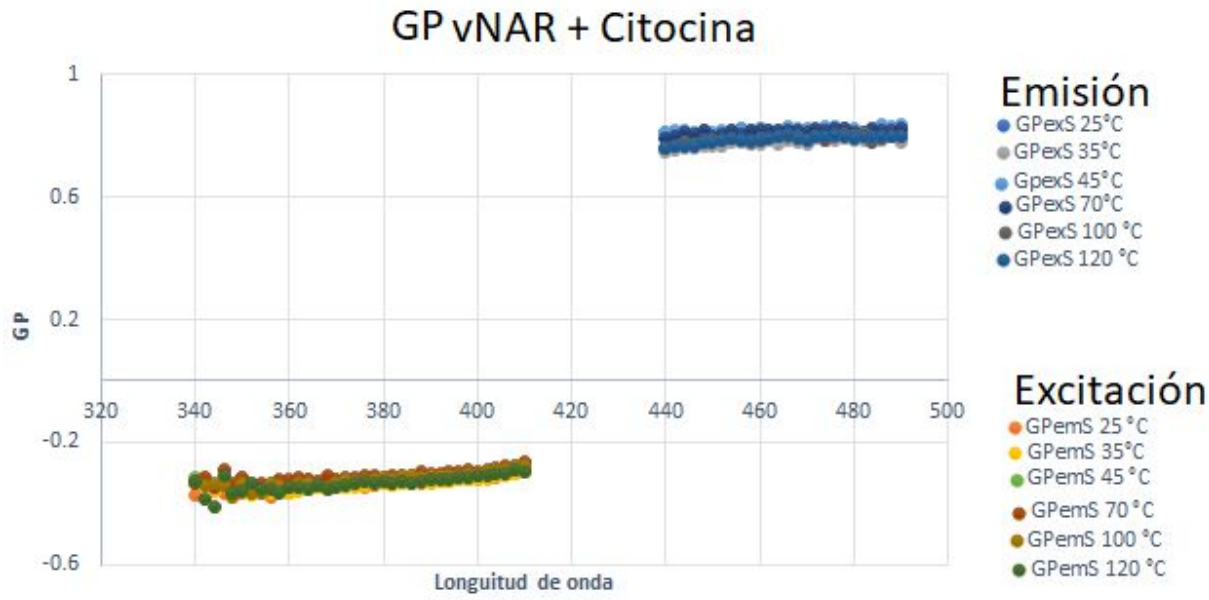


Figura 6. Espectros de emisión (GPem) y excitación (GPex) de la unión de vNAR + citocina a diferentes temperaturas a)25 °C, b)35 °C, c)45 °C, d)70 °C, e)100 °C y f)120 °C. Los espectros de excitación leídos a 325 nm y 390 nm se presentan en color rojo y azul, respectivamente. Los espectros de emisión leídos a 325 nm y 390 nm se presentan en color gris y amarillo, respectivamente.

CONCLUSIONES

En el presente proyecto se logró la producción del anticuerpo de dominio vNAR en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, empleando la producción en matraz a pequeña escala, obteniendo un rendimiento mayor en condiciones desnaturalizantes empleando medio de cultivo TB a 37 °C, 300 rpm y 3 horas de inducción. Con base en estos resultados, aún hay parámetros que deben abordarse con la finalidad de

superar los niveles de expresión de proteínas alcanzados en este trabajo, por ejemplo la optimización de la producción de proteína y el posible escalamiento a nivel de biorreactor.

Con base a los resultados mostrados en las pruebas de termoestabilidad, estabilidad a pH y capacidad de reconocimiento molecular al antígeno del anticuerpo vNAR después de haberse sometido a diferentes condiciones de incubación, este dominio vNAR derivado de las inmunoglobulinas del tiburón demuestran muy buenas propiedades de estabilidad a pH y a temperaturas extremas, manteniendo afinidad contra el antígeno, que en este caso tiene valor diagnóstico o terapéutico debido a su participación en el desarrollo de tumores sólidos, además de otros padecimientos.
Los resultados obtenidos del DSC y fluorometría demuestran claramente que los anticuerpos vNAR son capaces de mantenerse estables, al no sufrir cambios estructurales al ser expuesto a un ambiente adverso mediante cambios de temperatura, pH y tiempo de incubación. Estos resultados revelados por el estudio de fluorescencia y termoestabilidad confirman el comportamiento fisicoquímico de estos anticuerpos.

La estabilidad inherente no sólo aumenta el potencial y la variedad de opciones terapéuticas y diagnósticas de los dominios vNAR sino también, demuestra que las terapias basadas en estos fragmentos tendrían una larga duración en almacén, particularmente cuando la refrigeración no siempre está disponible. Además, también pueden abrir oportunidades para el desarrollo de reactivos o aplicaciones de diagnóstico ¨point of care¨.

REFERENCIAS

[1] M. Kovaleva, L. Ferguson, J. Steven, A. Porter and C. Barelle, "Shark variable new antigen receptor biologics – a novel technology platform for therapeutic drug development", *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 14, no. 10, pp. 1527-1539, 2014.

[2] J. Reichert, C. Rosensweig, L. Faden and M. Dewitz, "Monoclonal antibody successes in the clinic", *Nature Biotechnology*, vol. 23, no. 9, pp. 1073-1078, 2005.

[3] S. Zielonka, M. Empting, J. Grzeschik, D. Könning, C. Barelle and H. Kolmar, "Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks", *mAbs*, vol. 7, no. 1, pp. 15-25, 2014.

[4] A. Beldarin, "Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas", Biotecnología Aplicada, vol. 18, no. 1, pp. 10-18, 2006.

[5] K. Griffiths, O. Dolezal, K. Parisi, J. Angerosa, C. Dogovski, M. Barraclough, A. Sanalla, J. Casey, I. González, M. Perugini, S. Nuttall and M. Foley, "Shark Variable New Antigen Receptor (VNAR) Single domain antibody fragments: stability and diagnostic Applications", *Antibodies*, vol. 2, no. 1, pp. 66-81, 2013.

[6] C. D'Antuono, M. Fernández, N. Sterin-Speziale and D. Bernik, "Lipid±Protein Interactions in Rat Renal Subcellular Membranes: A Biophysical and Biochemical Stud", Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 382, no. 1, pp. 39-47, 2000.

[7] K. Gaus, T. Zech and T. Harder, "Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy (Review)", Molecular Membrane Biology, vol. 23, no. 1, pp. 41-48, 2006.

[8] B. Kaur, F. W. Khwaja, E. A. Severson, S. L. Matheny, D. J. Brat, E. G. Van Meir, ¨Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis¨, Neuro Oncol, vol. 7, no. 2, pp. 134-53, 2005.

[9] M. Kovaleva, L. Ferguson, J. Steven, A. Porter and C. Barelle, "Shark variable new antigen receptor biologics – a novel technology platform for therapeutic drug development", Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 14, no. 10, pp. 1527-1539, 2014.

[10] J. Velázquez and M. Fernández, "GPS, the slope of laurdan generalized polarization spectra, in the study of phospholipid lateral organization and Escherichia coli lipid phases", Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 455, no. 2, pp. 163-174, 2006.

[11] J. L. Cleland, S. E. Builder, J. R. Swartz, M. Winkler, J. Y. Chang and D. I. C. Wang, ¨Polyethileneglycol enhanced protein refolding¨, Nature Publishing Group, vol. 10, pp. 1013-1019, 1990.

USO TERAPEUTICO DE UN ANTICUERPO vNAR CON CAPACIDAD DE RECONOCER A LA CITOCINA HUMANA TGF-β.

[1]Burciaga-Flores, M., [1]Reza-Escobar, E., [2]Licea-Navarro, A., [3*]Camacho-Villegas, T.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Colinas de la Normal, CP 44270,Guadalajara, Jalisco, México.
2. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Departamento de Innovación Biomédica, Carretera Ensenada-Tijuana, 3918, Zona Playitas, CP 22860, Ensenada, BC, México.
3. CONACYT- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Colinas de la Normal, CP 44270,Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: tcamacho@ciatej.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN
Se han desarrollado diversas inmunoterapias basadas en anticuerpos monoclonales como tratamientos para enfermedades en donde se sobre-expresa la citocina TGF-β. Sin embargo, se han observado efectos secundarios, causados principalmente por el tamaño de las IgG (150 kDa) y la inmunogenicidad asociada a la región Fc. En años recientes, se han propuesto los dominios variables del Nuevo Receptor de Antígeno (vNAR) como una alternativa atractiva para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, debido a sus características; bajo peso molecular, estabilidad fisicoquímica, especificidad, fácil acceso a receptores y sitios crípticos de enzimas, entre otros. En el presente trabajo, se empleó un dominio vNAR procedente de una biblioteca génica del tiburón *Heterodontus francisci* no inmunizado, aislando un vNAR (T-1) por despliegue en fagos después de tres rondas de selección contra la citocina recombinante humana TGF-β1 isoforma 1 (rhTGF-β1). Se clonó y expresó en *E. coli*, tanto a nivel matraz y en biorreactor. Adicionalmente, demostramos la capacidad del vNAR de reconocimiento específico contra rhTGF-β1 mediante ELISA, así como del TGF-β activo presente en lágrimas humanas mediante Western blot. Se desarrollaron ensayos de micro-aglutinación cuyos resultados sugieren una posible aplicación de diagnóstico rápido para determinar la sobreexpresión de la citocina TGF-β en diversos padecimientos, por ejemplo los oculares.

Palabras clave: Anticuerpos; vNAR; neutralización; citocinas; rhTGF-β1.

INTRODUCCIÓN

Se han identificado los componentes principales del sistema inmune adaptativo como los anticuerpos, los receptores de células T y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I y II, en peces cartilaginosos incluyendo a tiburones, rayas y quimeras [1]. El sistema inmunológico adaptativo de los tiburones tiene la capacidad de generar una respuesta humoral específica [2]. Los IgNAR son un subconjunto único de anticuerpos que consta de cinco dominios constantes (cNAR) y un dominio variable (vNAR). Los vNAR son dominios de entre 12 y 15 kDa los cuales representan el dominio más

pequeño de origen natural que mantiene su capacidad de unión al antígeno [3]. Están formados únicamente por cadena pesada y se han descrito en diversas especies de tiburones, como es el caso del tiburón cornudo *Heterodontus francisci*. Se ha demostrado que los fragmentos de anticuerpo vNAR pueden ser aislados, clonados y expresados en *E. coli* y *P. pastoris* conservando su capacidad de unión al antígeno, de la misma forma en que lo hacen los anticuerpos convencionales. Los dominios vNAR, están conformados únicamente por 2 regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en comparación con los anticuerpos convencionales que poseen seis CDRs [4]. Por otra parte, existen referencias bibliográficas que reafirman la necesidad de mediar las citocinas involucradas en diversas enfermedades. Especialmente, se evidencia el hecho de que muchos de los eventos característicos en diversas patologías (fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, cáncer, tuberculosis, entre otras) están asociadas a la sobreexpresión de TGF-β y que pueden ser bloqueadas por la administración de agentes neutralizantes de TGF-β confirmando así, la relevancia de ésta citocina y la necesidad de encontrar agentes terapéuticos con capacidad de neutralizarla o modularla.

En el presente trabajo, se empleó un dominio vNAR procedente de una biblioteca génica previamente generada del bazo del tiburón *Heterodontus francisci* no inmunizado. Se seleccionó un dominio vNAR con capacidad de reconocer a la citocina recombinante humana (rhTGF-β1). Los resultados mostrados en las siguientes secciones, resaltan la importancia del anticuerpo, ya que sugieren que puede ser empleado con fines de diagnóstico para determinar la sobreexpresión de la citocina TGF-β o con fines de terapia, para modular el efecto de altas concentraciones de la citocina en diversos padecimientos por ejemplo, el ojo seco.

METODOLOGÍA

Producción del dominio vNAR a nivel matraz

Se indujo la expresión del dominio vNAR empleando la cepa *E. coli* BL21(DE3) previamente transformada con los plásmidos recombinantes pComb3x y pACR2.1, respectivamente. El plásmidos se emplearon para electroporar 50 µL de células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) y 50 ng aproximadamente de plásmido previamente enfriado por 1 min en un tubo de 1.5 mL. Se electroporó empleando una celda de 0.2 cm previamente enfriada bajo las siguientes condiciones: 2.5 kV, 25 µF, 200 Ohm y 5 ms. Las células transformadas fueron recuperadas en 3 mL de medio de cultivo SOC e incubadas a 37 °C, 250 rpm por 1 h. Se incubaron en un volumen final de 6 mL, ajustando el volumen con medio LB y 100 µg/mL de ampicilina, se incubó toda la noche a 37 °C y 250 rpm. De este pre-inóculo, se inocularon cultivos de 25 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina a una proporción de 1/100 (relación preinóculo: cultivo final), monitoreando la DO_{600nm} cada hora, hasta obtener una lectura de 0.7- 0.9. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se agregó el inductor IPTG (Promega) a una concentración final de 1 mM y se incubó por 5 horas totales a 37 °C y 250 rpm. Se tomó una muestra representativa de 1 mL cada hora, durante las primeras 5 horas después de la inducción. Se monitoreó la DO_{600} y se graficaron los datos. Se empleó la fórmula de $C_1V_1=C_2V_2$ para ajustar el volumen de las alícuotas a la misma DO del tiempo 0 (T0) para el posterior análisis de las proteínas por SDS-PAGE al 12%.

Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendiendo el paquete celular en 100µL de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, PMSF 1mM) y mediante ultrasonido con pulsos de 10 segundos y 40 segundos de enfriamiento, repitiendo 3-5 veces. Se separaron las fracciones soluble e insoluble centrifugando por 15 minutos a

13,000 rpm a 4 °C, se separó la fracción soluble y se mezclaron 20 µL de la fracción soluble y 20 µL de buffer de carga 2X (Tris-HCl 65.8 mM pH 6.8, glicerol 26.3%, SDS 2.1%, azul de bromofenol 0.01%, 2-βmercaptoetanol 355 mM), posteriormente las muestras se calentaron durante 5 minutos a 94 °C. Las muestras de cada hora de cultivo se analizaron mediante SDS-PAGE al 12 %. El gel se corrió a 120 Volts constantes hasta que el frente de azul de bromofenol llegara a la base del gel. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie (1.25 g de azul de Coomassie G-250, 250 mL de metanol, 50 mL de ácido acético, 200 mL de agua destilada) durante 30 min. Posteriormente, para visualizar las bandas de las proteínas se destiñó el gel con la solución de desteñido (250 mL de metanol, 62.5 mL de ácido acético, 312.5 mL de agua) hasta obtener el contraste deseado.

Producción del dominio vNAR anti-TGF-β en biorreactor en proceso de lote agitado

Una vez corroborada la expresión del anticuerpo vNAR, se seleccionó una clona de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido recombinante pACR2.1-vNAR(T-1), se realizaron fermentaciones en biorreactor con un volumen de 2 L para producir una mayor cantidad de proteína. Se inocularon dos matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de medio LB y ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, cada uno. Se incubaron toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se verificó la DO_{600nm} (aproximadamente 2.5) y se seleccionó un cultivo para inocular el biorreactor. Se agregó bajo condiciones de asepsia el antibiótico ampicilina (100 µg/mL) y $MgCl_2$ 1mM, así como el inóculo de 40 mL procedente del matraz. Se realizó toma de muestras antes de inocular el biorreactor para usarla como blanco en las mediciones; después de la inoculación y cada dos horas de cultivo. Se analizó la DO_{600nm} para verificar la cinética de crecimiento del cultivo y se continuó analizando hasta el final del mismo, después de 18 horas. El cultivo se creció a condiciones controladas de TOD (tensión de oxígeno disuelto) a 30% ± 10 (con respecto al valor de saturación en aire) con incrementos automáticos de velocidad de agitación; temperatura a 37 °C ± 1; agitación a 250–550 rpm (revoluciones por minuto) y pH de 7.4 ± 1.

El cultivo fue inducido a una DO_{600nm} de 0.6, ya que es cuando el cultivo celular se encuentra en la fase exponencial. Se empleó el inductor IPTG a una concentración final de 0.5 mM, la inducción se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C por 18 horas, manteniendo todas las condiciones controladas.

Una vez transcurridas las 18 horas, el cultivo celular fue centrifugado empleando una centrifuga Eppendorf 5417 R a 4,000 rpm a 4 °C por 30 minutos en lotes de 50 mL. Se descartó el sobrenadante y el paquete se conservó a -20° C.

Análisis del vector pACR2.1 durante el proceso de fermentación

Para confirmar la permanencia del vector pACR2.1 en las células bacterianas durante todo el proceso de fermentación, se evaluó la calidad y cantidad del ADN plasmídico en *E. coli* BL21(DE3) a lo largo de una cinética de 5 horas de producción del dominio vNAR. Se realizó la toma de una muestra representativa a cada hora y se leyó la absorbancia a DO_{600nm}, se ajustó la $D0_{600nm}$ respecto a la obtenida del tiempo 0, considerando un volumen de 2 mL. Se realizó extracción de ADN plasmídico mediante el uso del kit Pure Yield Miniprep System de Promega, se cuantificó mediante Nanodrop. Posteriormente, se evaluó la calidad del ADN plasmídico (500 ng por cada tiempo evaluado) mediante electroforesis en un gel preparado con 30 mL de agarosa al 1% con 3 µL SYBR® Safe 1000X (Invitrogen), durante 45 min a 80 Volts. Los productos amplificados se visualizaron en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ System) exponiendo el gel a luz UV y se capturó la imagen.

Selección del método de extracción de proteínas

Con el objetivo de determinar cuál método de extracción resultaba más apropiado para obtener la proteína, se realizó una comparación del método de extracción por ultrasonido (descrito en secciones anteriores), extracción por cuerpos de inclusión y extracción periplásmica por choque osmótico (siguiendo lo sugerido en The QIAexpressionist™).

En una placa de ELISA de 96 pozos, se colocaron por triplicado 50 µL de la proteína obtenida por ultrasonido, cuerpos de inclusión y choque osmótico (25 µL de PPB y 25 µL $MgSO_4$) y la placa se incubó 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se descartó la solución y los pozos se bloquearon con 150 µL de leche descremada al 3%-TBS 1X incubando 1 hora a 37 °C. Los pozos se lavaron tres veces con Tween 0.05%-TBS 1X. A cada pozo se le agregaron 50 µL de anticuerpo anti-His (ROCHE) diluido 1:1,000 en leche descremada al 3%-TBS 1X, y la placa se incubó 1 hora a 37 °C. La placa se lavó tres veces con Tween 0.05%-PBS 1X y se añadieron 50 µL de sustrato para peroxidasa (ABTS 20 mg/mL, buffer de citratos 1X, H_2O_2 0.3%). La placa fue leída después de 20 minutos a 405 nm en un lector de ELISA (BioRad).

Una vez analizados los resultados, se seleccionó el método de extracción de proteínas secretadas al espacio periplásmico mediante choque osmótico. Se analizaron ambos extractos por separado (PPB y $MgSO_4$) para determinar en cuál de los extractos se recuperaba el vNAR y evitar correr el riego de diluir la proteína al unir ambos extractos. Se evaluaron 50 µL de PPB y 50 µL de $MgSO_4$, con sus respectivos triplicados. El resto del ensayo se realizó bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente para ELISA.

Purificación del dominio vNAR mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados

Se realizó la purificación del dominio vNAR mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). La purificación se llevó a cabo utilizando la resina NiTa (Thermo Fisher Scientific). La etiqueta de seis histidinas del vNAR recombinante permitió la retención de la proteína para su purificación. La columna se lavó con 10 volúmenes de agua destilada y después fue equilibrada con 20 volúmenes de buffer de unión (20 mM de imidazol, 50 mM de fosfato monosódico, 300 mM NaCl), por otra parte, se preparó el extracto periplásmico (correspondiente a la solución de $MgSO_4$ 5mM) clarificando mediante centrifugación a 4°C y 10,000 rpm durante 30 minutos, posteriormente se filtró por membranas de 0.9 mm de corte (manteniendo los extractos en frío en todo momento). Después, se ajustó la concentración de imidazol a 20 mM y pH 8. Posteriormente, se pasó por gravedad a través de la columna. Durante el desarrollo del proceso se monitoreó la absorbancia a 280 nm en un lector automático de micro placa para determinar el nivel de saturación de la resina. Se realizó un lavado de la columna con 20 mL de buffer de lavado (20 mM de imidazol, 50 mM de fosfato monosódico, 300 mM NaCl). Se realizó la elución en 5 fracciones, empleando el volumen de elución de 250 µL de buffer de elución (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, pH 8) se tapó la columna y se dejó reposar 5 minutos entre cada una de las fracciones, transcurrido el tiempo se destapó la columna y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL.

Para el análisis de la purificación mediante SDS-PAGE, previamente se realizó la precipitación de proteínas de las muestras obtenidas en la purificación, se precipitaron 80 µL de cada muestra empleando 15 µL de ácido tricloro-acético al 100% (TCA). Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C

y se centrifugaron a 13, 000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y el paquete precipitado se lavó con 1 mL de acetona fría. Las muestras se centrifugaron bajo las mismas condiciones y se decantó el sobrenadante. El pellet se secó durante 5 minutos en termoblock (AccuBlock, Labnet) a 90 °C y se resuspendió en buffer 2x (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004 %). Las muestras se incubaron por 5 min a 90 °C y posteriormente se incubaron en hielo y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. El gel se corrió a 120 Volts constantes, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Posteriormente, los geles fueron teñidos durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante empleando azul de Coomassie. Se destiñó el gel durante una hora utilizando una solución de desteñido (etanol 40%, ácido acético 10%, agua 50%) en constante agitación. Finalmente, para visualizar las bandas de las proteínas se destiñó el gel hasta obtener el contraste deseado.

Cuantificación de la proteína empleando ácido bicinconínico (BCA)
La proteína fue dializada contra PBS 0.5X y cuantificada empleando el kit Micro BCA protein assay (Thermo Scientific). Se interpolaron los resultados de absorbancia obtenidos de las eluciones para determinar su concentración con las absorbancias de los estándares de BSA conocidos.

ELISA de reconocimiento de rhTGF-β1 por el dominio vNAR
Se realizó un primer inmunoensayo ligado a enzima con la finalidad de evaluar la capacidad de reconocimiento del dominio vNAR (purificado y dializado) contra la isoforma TGF-β1 (Peprotech). En cada pozo, se colocaron 100 ng de la citocina TGF-β1 considerando un volumen de 50 µL en pozo de placa de ELISA. La placa se incubó durante 2 horas a 37 °C. La solución fue descartada y la placa se bloqueó con 150 µL de leche descremada al 3%-TBS 1X por 2 horas a 37 °C. La solución se descartó y se lavaron los pozos con 200µL de solución TBS 1X-tween 20 al 0.05%, después se agregó en cada pozo 250 ng de extracto periplásmico. La placa se incubó por una hora a 37 °C. Los pozos se lavaron con 200 µL de solución TBS 1X-tween 20 al 0.05% y se agregaron 50 µL de anticuerpo anti-His diluido 1:1,000 en solución de leche descremada 1%-TBS 1X y se incubó la placa por 2 h a 37 °C. Los pozos se lavaron tres veces y se agregaron 50 µL de solución de revelado TMB ELISA Reagent (Thermo Scientific). La placa se incubó a 37 °C por 10 minutos y se analizó en espectrofotómetro Benchmark Microplate Reader (BioRad) a 405 nm. Se usó BSA 1%-TBS 1X como control negativo de reconocimiento.
Como control positivo de reconocimiento se empleó el anticuerpo comercial anti TGF-β (T0438, Sigma) y su respectivo anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa diluido 1:1,000 en solución de leche descremada 1%-TBS 1X.

Evaluación de la capacidad de reconocimiento del dominio vNAR por el TGF-β activo empleando una muestra biológica
Con el propósito de demostrar que el dominio vNAR anti-TGFβ presenta la capacidad de reconocimiento de la citocina en su forma activa, es decir, sin el péptido asociado a latencia (LAP), se analizó mediante Western blot el reconocimiento del dominio vNAR contra TGF-β presente en lágrimas humanas previamente acidificadas. De acuerdo a la literatura, se ha sugerido que TGF-β es el principal responsable en la patogénesis de enfermedades inflamatorias oculares proliferativas y degenerativas [5].

Para realizar este análisis, se colectaron 4 mL de lágrimas, donadas por una persona sana, sin enfermedad ocular aparente. Las lágrimas se concentraron utilizando filtros para centrífuga Amicon Ultra-15 de 3,000 MWCO (hasta tener un volumen final de 2 mL). Las lágrimas se acidificaron utilizando ácido clorhídrico 1N hasta llevarlas a un pH de 3 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con el fin de activar a la citocina TGF-β. Terminado el tiempo de incubación se neutralizaron con NaOH 1N.

Se realizó un gel de poliacrilamida al 12%, en el que se cargaron 50 µL de proteína total de lágrima concentrada mezclada con 50 µL de buffer de carga SDS-PAGE 2X. La muestra se desnaturalizó a 95 °C por 10 minutos. Se realizaron la corrida electroforética y la electrotransferencia de acuerdo a los parámetros descritos anteriormente. La membrana se bloqueó 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante en solución de bloqueó (leche 5%–PBST). Se descartó la solución y la membrana se colocó toda la noche a 4 °C en leche descremada 3%–PBST conteniendo 0.0875 µg/mL de anticuerpo vNAR anti-TGF-β. La membrana se lavó con PBS 1X–Tween 0.05% y se colocó toda la noche a 4 °C en leche descremada 3%–PBS 1X–Tween 0.05% conteniendo el anticuerpo anti-His en dilución 1:1,000. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST y se reveló utilizando HRP Development Color (BioRad). Se capturó la imagen empleando fotodocumentador.

Micro aglutinación con partículas de látex

Los ensayos de aglutinación son considerados inmunoensayos basados en la reacción antígeno-anticuerpo. Durante el desarrollo del presente trabajo se realizaron dos ensayos de acoplamiento covalente, del TGF-β1 a partículas de látex modificadas con $–NH_2$ (AP-6010, Spherotech) y –COOH (L3280, Sigma). Estos ensayos se realizaron en paralelo de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación (Figura 1).

Se emplearon 40 µL de partículas de látex al 5% w/v y fueron diluidas con 100 µL de buffer MES (10mM, pH 7.8) en un tubo de 1.5 mL de capacidad, se mezclaron en vórtex durante 1 min a máxima velocidad y después fueron sedimentadas por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante con ayuda de una micro pipeta. Para la funcionalización de las partículas, éstas se resuspendieron en 100 µL de buffer MES/EDC (10mM MES, 2% EDC, pH 8), se agitaron vigorosamente con ayuda de vórtex a máxima velocidad durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 6.25 µg de TGF-β1 (Peprotech) en un volumen de 100 µL de buffer MES (10mM, pH7.8) y se agitaron en oscilador a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez finalizado este periodo de incubación, se centrifugaron las partículas a 14,000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante por pipeteo. Las partículas conjugadas por acoplamiento covalente al TGF-β1 se re-suspendieron en 200 µL de PBS 0.5X y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para la formación del complejo primario en donde el TGF-β1 es reconocido por el dominio vNAR, se realizaron tres mezclas independientes en relación 1:1: a) 10 µL de partículas + 10 µL de vNAR (0.6mg/mL), b) control positivo: 10 µL de partículas + 10 µL de IgG anti TGF-β (0.6mg/mL T0438, Sigma) y c) Control negativo: 10 µL de partículas + 10 µL de EDC 0.2%. Se incubó la placa con las mezclas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la formación del complejo secundario, se empleó un anti-His (para el reconocimiento del dominio vNAR) y un anti-ratón (para el reconocimiento del control positivo) diluidos 1:100 en buffer PBS 1X, pH 7.4. Se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos y se observó al microscopio.

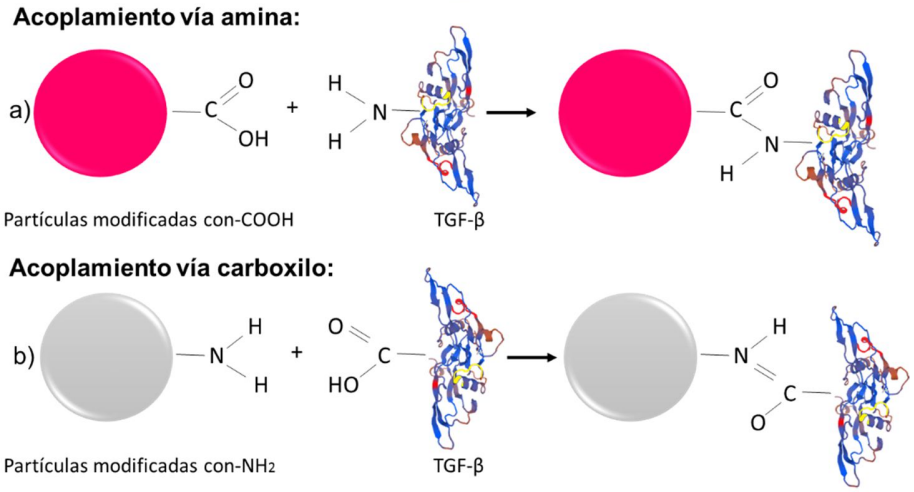


Figura 1. Esquema de acoplamiento covalente del TGF-β1 a las partículas de látex. a) Partículas modificadas con –COOH (L3280, Sigma) que unen al $–NH_2$ del TGF-β1, b) Partículas modificadas con $–NH_2$ (AP-60-10, Spherotech) que unen al –COOH del TGF-β1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Producción del dominio vNAR a nivel matraz

Una vez determinada la presencia del inserto de interés en el vector recombinante de la clona 7, se realizó una electroporación de células *E. coli* BL21 (DE3) para el desarrollo de una cinética de expresión del dominio vNAR anti-TGF-β contenido en los vectores recombinantes pComb3X y pACR2.1 respectivamente. El lisado total de las fracciones correspondientes al espacio periplásmico tomadas en diferentes tiempos post-inducción se analizaron mediante un SDS-PAGE al 12%.

De acuerdo a la Figura 2a, se puede observar que existe un aumento en la expresión de la proteína a partir de la tercera y quinta hora después de haber realizado la inducción, además se sugiere que el plásmido pACR2.1 favorece la expresión del dominio vNAR en comparación con el vector pComb3X. Adicionalmente, se evaluó la proteína obtenida a las 5 horas post-inducción con IPTG para la inmunodetección del dominio vNAR mediante el reconocimiento de la etiqueta de histidinas (Figura 2b). Se corroboró la presencia del dominio vNAR de aproximadamente 16 kDa al emplear ambos vectores de expresión sin embargo, la señal obtenida al analizar el vector pComb3X es menor en comparación con la señal obtenida al evaluar el vector pACR2.1, lo que sugiere que la expresión de la proteína recombinante es mejor al emplear el vector pACR2.1.

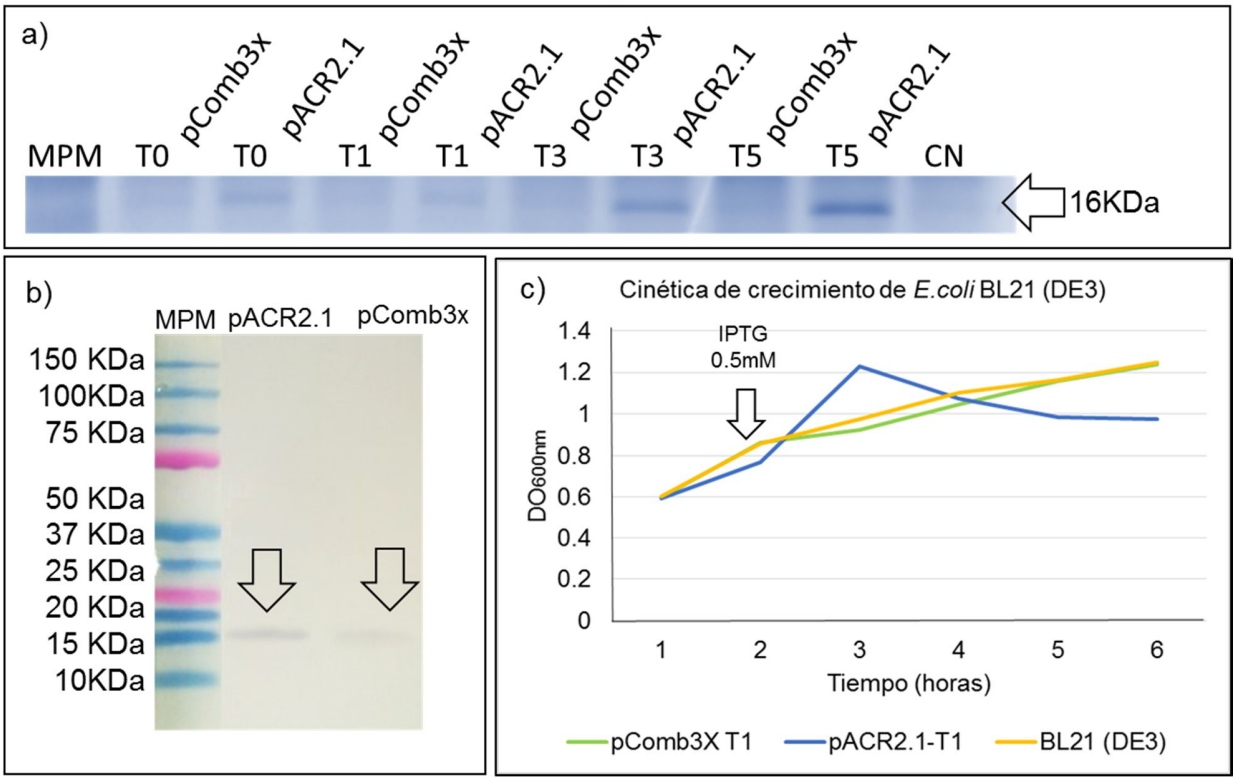


Figura 2. Análisis de la cinética de expresión del dominio vNAR anti TGF-β en los vectores: pACR2.1 y pComb3X. a) Análisis en SDS-PAGE 12%, teñido con azul de Coomassie. MPM: marcador de peso molecular, T0: tiempo 0 horas de inducción, T1, T3, T5: Tiempo a 1, 3 y 5 horas después de la inducción, respectivamente, b) Inmunodetección de dominio vNAR expresado en dos sistemas de expresión. MPM: Marcador de peso molecular Precision plus Protein Dual Color (BioRad), pACR2.1: dominio vNAR expresado empleando el vector pACR2.1 y pComb3X: dominio vNAR expresado empleando el vector pComb3X. c) Cinética de crecimiento de cepa *E. coli* BL21 (DE3) con los vectores pComb3X (color verde), pACR2.1 (color azul) y sin inserto de interés (color amarillo).

Producción del dominio vNAR en biorreactor

Se graficaron las condiciones físicas (Figura 3a) que fueron monitoreadas en el biorreactor durante el proceso de fermentación conteniendo el cultivo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) que expresa el dominio vNAR anti-TGF-β. Las condiciones de TOD (30%), pH (7.4) y temperatura (37°C) fueron controladas exitosamente durante todo el proceso de fermentación. Sin embargo, al realizar el escalamiento a biorreactor, deben considerarse modificaciones que permitan aumentar la producción del dominio vNAR, por ejemplo: a) determinar si la translocación del dominio vNAR anti-TGF-β al espacio periplásmico (Figura 3b), produce un efecto tóxico para *E. coli*, b) confirmar que el vector pACR2.1 se mantiene en la célula bacteriana durante todo el proceso de fermentación, ya que debido al tiempo de replicación que muestra la cepa en el escalamiento del proceso, se aumenta considerablemente el tiempo necesario para producir una buena cantidad de proteína recombinante. Con el objetivo de considerar los puntos anteriormente mencionados se realizó la evaluación del plásmido recombinante durante el bioproceso de producción del dominio vNAR realizado en las mismas condiciones descritas. En la Figura 3c-d, se muestra el resultado obtenido del análisis del plásmido recombinante en diferentes

tiempos post-inducción. En donde se puede observar que la calidad del plásmido pACR2.1 se mantiene durante todo el proceso de fermentación. La curva de crecimiento (Figura 3e) observada presentó un tiempo de duplicación de 2 horas.

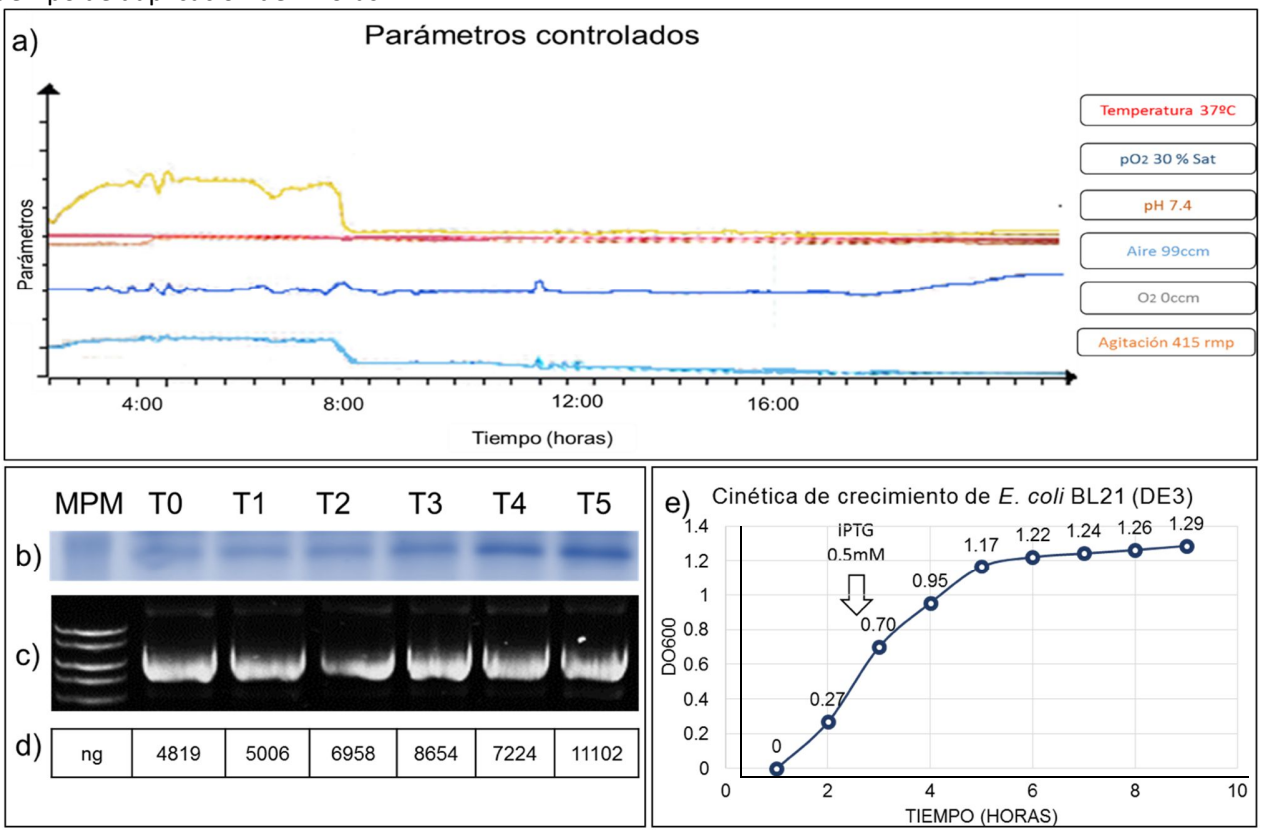


Figura 3. Análisis del ADN plasmídico procedente de *E. coli* BL21 (DE3) a lo largo de una cinética de 5 horas de producción del dominio vNAR. a) Gráfico de los parámetros controlados durante el bioproceso, b) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie, SP: Proteína sin purificar, MPM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color (BioRad), NR: No retenido en columna, L1: Lavado 1, E1-E5: Fracciones de elución. c) Gel de agarosa 1% teñido con Sybr Safe. E. Escalera 100-1000 pb. T0-5: Tiempo en horas pos-inducción. d) cuantificación del ADN plasmídico obtenido en los distintos tiempos post-inducción. e) Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) durante la inducción de expresión del dominio vNAR en biorreactor.

Selección del método de extracción

Con el objetivo de seleccionar el método óptimo para extracción de proteína, se realizó una ELISA de expresión del dominio vNAR obtenido por extracción periplásmica, cuerpos de inclusión y ultrasonido. En la evaluación se analizaron también diferentes tiempos de recuperación de la proteína para corroborar cual es el tiempo ideal para detener el proceso de fermentación.

En este análisis, se emplearon muestras obtenidas a las 4 y 18 horas post-inducción para corroborar que es posible obtener proteína de acuerdo con lo observado en la Figura 4, como resultado fue posible recuperar aproximadamente la misma cantidad de proteína a las 4 y 18 horas. Además, el método de

extracción por choque osmótico permite obtener prácticamente la misma cantidad de proteína en comparación con la obtenida mediante cuerpos de inclusión, de tal forma que para el desarrollo de este proyecto, se decidió procesar los paquetes celulares mediante el método de extracción periplásmica por choque osmótico, ya que este método permite recuperar proteína de forma soluble e involucra menos pasos de manipulación de la proteína, al no ser necesarios pasos posteriores de plegamiento de la proteína y por lo tanto es un método más económico.

Se realizó una ELISA del dominio vNAR anti-TGF-β para determinar si al realizar la extracción periplásmica por choque osmótico, la proteína era recuperada en la solución PPB o en la solución de $MgSO_4$ 5mM. Con base en lo observado en el gráfico de la Figura 4, se sugiere que la proteína vNAR queda contenida, en su mayoría, en la solución de $MgSO_4$, por lo tanto las purificaciones posteriores se realizaron empleando únicamente ésta solución.

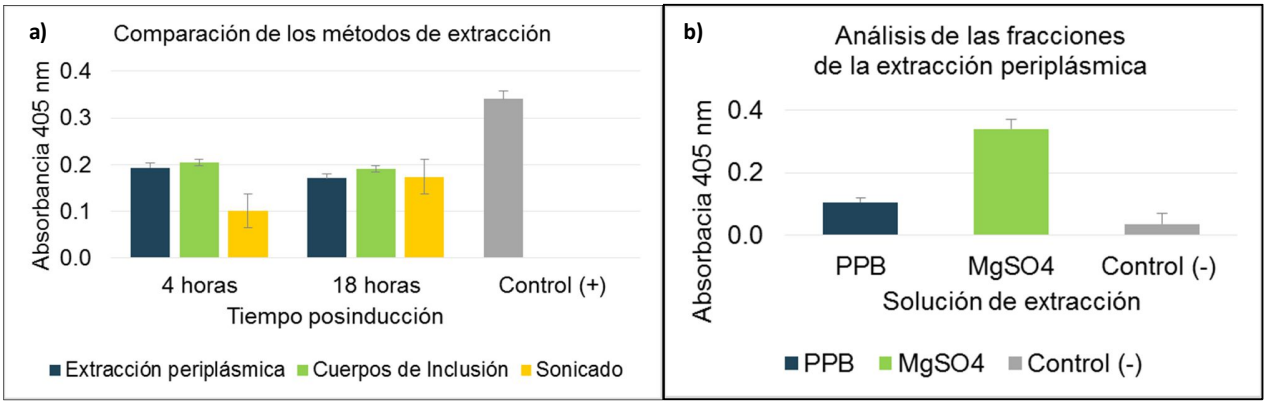


Figura 4. a) Comparación de los métodos de extracción de proteína. Proteína obtenida mediante extracción periplásmica (color azul), proteína obtenida por cuerpos de inclusión (color verde), proteína obtenida por sonicado (color amarillo), el control positivo se muestra de color gris (proteína recombinante con etiqueta de histidinas como control de reacción colorimétrica). b) Análisis de las fracciones de la extracción de proteína de extracto periplásmico. PPB: Solución al 20% de sacarosa (color azul), $MgSO_4$: Solución de Sulfato de magnesio 5mM (color verde).

Purificación del dominio vNAR mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados

La proteína extraída, se purificó por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante de la resina Ni-NTa (Thermo Fisher Scientifc) y se analizó mediante geles de poliacrilamida al 12%.

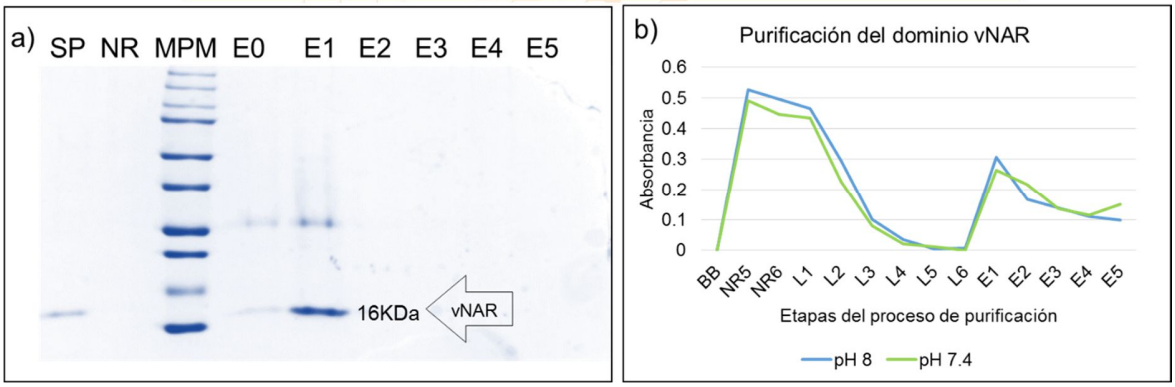


Figura 5. Condiciones de purificación. a) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie, SP: proteína sin purificar, MPM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color (BioRad), NR: No retenido en columna, L1: Lavado 1, E1-E5: Fracciones de elución. b) Monitoreo del proceso de purificación mediante lecturas de absorbancia a 280 nm.

El proceso de purificación permitió la recuperación de proteína en la primera fracción de elución (E1), la cual se dializó y cuantificó mediante micro BCA para ser empleada en los ensayos de reconocimiento.

Ensayos de reconocimiento del dominio vNAR hacia el TGF-β1

Para determinar si el dominio vNAR presenta la capacidad de reconocer a la isoforma 1 de la citocina recombinante humana TGF-β1, se empleó un inmunoensayo ligado a enzima.

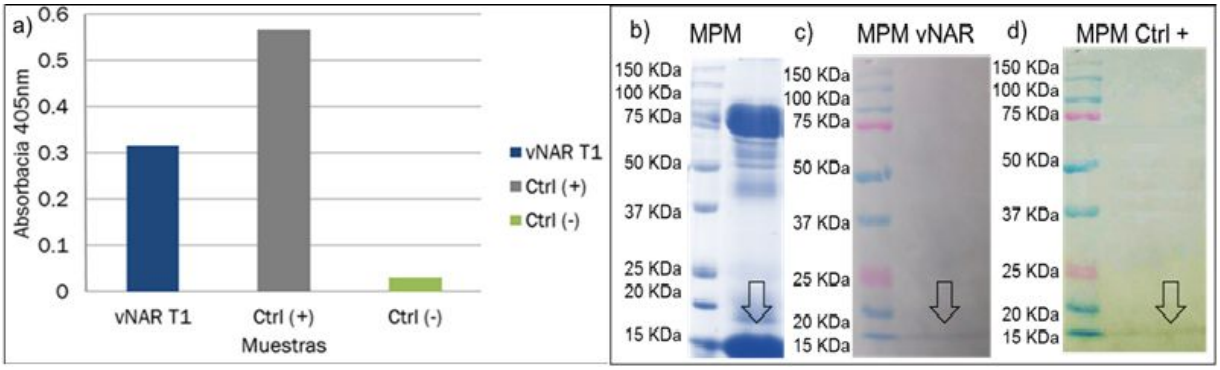


Figura 6. Ensayos de reconocimiento de TGF-β1. a) ELISA de reconocimiento de la isoforma rhTGF-β1 por el dominio vNAR (color azul), Ctrl (+): control positivo IgG comercial (T0438, Sigma) (color gris), Ctrl(-): control negativo BSA 1%-PBS 1X. Ensayos de reconocimiento de TGF-β presente en lágrimas humanas; b) SDS-PAGE 12% de proteína total obtenida de lágrima humana, gel teñido con azul de Coomassie, c) WB: proteína total obtenida de lágrima humana reconocida por el dominio vNAR, d) WB de proteína total obtenida de lágrima humana reconocida por el anticuerpo comercial T0438 (Sigma) (control +).

Los resultados mostrados en la Figura 6, indican que el dominio vNAR tiene la capacidad de reconocer a la isoforma 1 de la citocina TGF-β, coinciden con lo reportado por Camacho-Villegas (2012) [6] y Martínez-Olivares, (2014) [7] que indican que el anticuerpo vNAR anti-TGF-β expresado en *E. coli* y *P. pastoris* respectivamente, tiene la capacidad de reconocer a las 3 isoformas de TGF-β de mamífero. Debido a que las tres isoformas de esta citocina presentan una homología estructural y respecto a su

función biológica del 60 al 80% [8], se esperaría que el anticuerpo expresado en este proyecto tuviera la capacidad de reconocer las isoformas 2 y 3 sin embargo, deben realizarse otros experimentos que permitan comprobarlo.

Así mismo, mediante Western blot se demostró que el dominio vNAR presenta la capacidad de reconocer al TGF-β activo presente en lágrimas humanas muestra un SDS-PAGE 12% que fue teñido con azul de Coomassie y se puede apreciar una banda con señal en ~15KDa que corresponde al monómero de TGF-β presente en lágrimas humanas y a un conjunto de proteínas de pesos moleculares similares. Se conoce que los niveles de expresión del TGF-β en condiciones basales son extremadamente bajos y que incluso se requiere que se inicie un proceso inflamatorio para que la expresión de la citocina aumente a fentogramos, debido al reclutamiento de monocitos y linfocitos [9]. La Figura 6c, muestra la inmunodetección del TGF-β empleando el dominio vNAR como anticuerpo primario y un Ab anti-His como anticuerpo secundario. En la Figura 8d, se muestra el resultado de la detección del TGF-β mediante el anticuerpo comercial, T0438 (Sigma) como control positivo del reconocimiento de la citocina.

Estos resultados incrementan el potencial terapéutico que presenta el dominio vNAR anti TGF-β al convertirse en un prometedor agente terapéutico para ralentizar y/o detener el daño epitelial ocular observado en los procesos de inflamación crónicos y graves de la superficie ocular como el Síndrome de ojo seco (SOS), pterigium, queratoconjuntivitis atópica (AKC, por sus siglas en inglés) o queratoconjuntivitis vernal (VKC, por sus siglas en inglés) en los cuales se ha encontrado una sobreexpresión del TGF-β [10,11]

Micro aglutinación con partículas de látex

Se realizaron ensayos de micro aglutinación con micropartículas de látex a las cuales se les acopló rhTGF-β1 vía amina (-NH_2) y vía carboxilo (-COOH), respectivamente. Se observó aglutinación macroscópica en el uso del dominio vNAR (Figura 7a) y del control positivo (Figura 7c) lo que sugiere que es posible reconocer al TGF-β1 que ha sido unido covalentemente vía amina a las partículas de látex, empleando el dominio vNAR y que por lo tanto éste conserva su actividad biológica. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**a y d muestra el resultado de la aglutinación de partículas de látex modificadas con carboxilato que fueron acopladas covalentemente con rhTGF-β1 vía amina. Este efecto fue ocasionado por la formación de los complejos primario y secundario mediante el uso del dominio vNAR (0.6µg/µL) y un anti-His (diluido 1:100 en PBS 0.5x, pH7.4)

Al analizar el reconocimiento del TGF-β1 que fue acoplado vía carboxilo a las partículas de látex, fue posible observar aglutinación al emplear el dominio vNAR y el anti-TGF-β. Se observan los controles positivos empleados en ambos ensayos de aglutinación, encontrando que el anti-TGF-β comercial (T0438, Sigma) puede formar aglutinaciones más prominentes en comparación con el efecto detectado para el dominio vNAR. Este resultado puede ser atribuido a: 1) la diferencia de tamaños, siendo el anti-TGF-β comercial una IgG monoclonal de 150 kDa, mientras que el dominio vNAR es aproximadamente 11 veces más pequeño además y 2) el anticuerpo comercial tiene dos sitios de reconocimiento mientras el vNAR solo tiene uno.

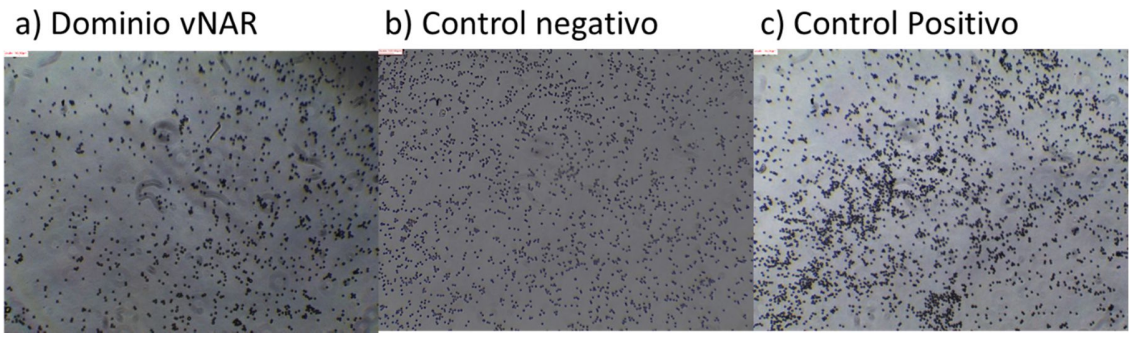


Figura 7. Ensayo de aglutinación con partículas de látex modificadas con $–NH_2$. funcionalizadas con rhTGF-β1 por acoplamiento covalente vía carboxilo. a) Formación del complejo primario y secundario mediante el uso del dominio vNAR (0.6µg/µL)/Ab Anti His 1:100, b) Control negativo: Perlas (AP-60-10, Spherotech) con 0.2% w/v de EDC-PBS 0.5X, c) Control positivo: formación de complejos primario y secundario mediante el uso de una IgG anti TGF-β (0.6µg/µL de T0438 de Sigma)/Ab Anti ratón 1:100.

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que es posible aislar anticuerpos de dominio sencillo vNAR partiendo de tiburones no inmunizados y que éstos anticuerpos poseen capacidad de reconocimiento y una alta afinidad por su antígeno [12]. El anticuerpo vNAR empleado para el desarrollo del presente trabajo, representa una opción atractiva de inmunoterapia para enfermedades en donde existe una desregulación del TGF-β, así como de diagnóstico *in situ* y *ex vivo* en enfermedades asociadas a la desregulación de la citocina. Como se mencionó en la sección de resultados, el anticuerpo vNAR anti-TGF-β, posee la capacidad de reconocer a la isoforma rhTGF-β1 y a la citocina presente en muestras biológicas. Cabe mencionar que debido al alto porcentaje de similitud entre las tres isoformas del TGF-β, se sugiere que el dominio vNAR tiene la capacidad de reconocer a las isoformas TGF-β2, -β3 lo cual podría ampliar sus aplicaciones. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para determinar si el anticuerpo presenta preferencia por el reconocimiento de alguna de las isoformas del TGF- β, así como para determinar la capacidad de neutralización *in vitro* e *in vivo*.

REFERENCIAS

[1] A. Navarro, "Maduración in vitro de la afinidad del fragmento vNAR anti-VEGF165". Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, 2012.

[2] S. Greenberger, E. Boscolo , I. Adini, J.B. Mulliken and J. Bischoff, ¨Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile hemangioma-derived stem cells.¨ The New England Journal of Medicine, vol. 362, pp. 1005–1013, Mar 2010.

[3] R. Bojalil et al, ¨Anti-tumor necrosis factor vNAR single domains reduce lethality and regulate underlying inflammatory response in a murine model of endotoxic shock.¨ BMC Immunology, vol. 2, pp. 14-17, Apr 2013.

[4] O. Fajardo, "Generación de un anticuerpo bi-específico anti-CD19 y CD16 mediador de citotóxicidad tumoral CD16 dependiente". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, 2014.

[5] M. J. Benito Almazán, "Papel del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y eficacia de moléculas inhibidoras en la respuesta inflamatoria de la superficie ocular". Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, España, 2012.

[6] T. A. Camacho-Villegas, ¨Anticuerpos de dominio sencillo y quimérico de tiburón neutralizantes de citocinas humanas.¨ Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, 2012.

[7] C.E. Martínez- Olivares, ¨Purificación y evaluación citotóxica de un anticuerpo tipo vNAR neutralizante de TGF-β, aislado del tiburón *Heterodontus francisci.*¨ Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, 2014.

[8] U. Bartram, C. P. Speer, ¨The Role of Transforming Growth Factor in lung development and disease.¨ *CHEST Journal,* vol. 125, pp. 754-765, Feb 2004.

[9] R. Hernández-Pando, ¨Participación del factor de transformación tumoral β en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica.¨ *Gac. Méd. Méx.* vol. 139, num. 2, pp. 135-138, 2003.

[10] C. Fang, ¨Elucidating the regulatory mechanisms of pterygium.¨ Doctoral Thesis. School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, United Kingdom, 2013.

[11] M.J. Benito Almazán, V. Calder, R. M. Corrales, C. García-Vázquez, N. Srihari, J. M. Herreras, M. E. Stern, M. Calonge, A. Enríquez-de-Salamanca, "Effect of TGF-β on ocular surface epithelial cells.¨ Experimental Eye Research, vol. 107, pp. 88-100, Feb 2013.

[12] S. Nuttall, et al, ¨A naturally occurring NAR variable domain binds the Kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*.¨ FEBS Lett, vol. 516, pp. 80-86, Apr 2002.

EFECTO DEL ACEITE DE SEMILLA DE *Prunus serotina var. capuli* en UN MODELO DE RATÓN DIABETICO.

Aguilera-Arana, M.A., Meza-Carmen, V., Nava-Barrios, L.M., *Ortiz-Alvarado, R.

Cuerpo Académico de Fisiopatologías-211, Fac. de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Calle Tzintzuntzan No. 173 Col. Matamoros.

*Autor para correspondencia: rortizalvarado@gmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

Las enfermedades de tipo no infeccioso como la Diabetes Mellitus, en la actualidad poseen un alto componente de control respecto al uso de medicamentos hipoglicemiantes como los derivados de las sulfonilureas (glibenclamida), que tienen el inconveniente de inducir una dislipidemia, secundaria. Por lo que el control dietético es fundamental en el éxito terapéutico de la enfermedad sin consecuencias como la dislipidemias. Por lo que el uso de compuestos nutraceuticos de origen natural en la dieta es una opción. De esta manera, se administró a dos grupos de ratones de la cepa Balb-c, inducidos al modelo de diabetes mellitus 1, por uso de estreptozotocina (150mg/kg de peso) la dieta AING-93 modificada con aceite proveniente de *P. serontina var. capuli*, al 4% de la composición original. Obteniendo después de 14 días de tratamiento, una disminución en la concentración de colesterol sérico del 47.3% en el grupo tratado con la dieta modificada por el aceite de semilla de capulin, no observando un cambio significativo en la fracción de trigilceridos séricos en los animales sometidos al tratamiento dietético modificado respecto a los animales con la dieta estandard. Cabe mencionar que el aceite de semilla de *P. serótina var. Capulí* contiene Ácido linoleico 57.8%, Oleico 28.5% y ácido linoleico 7.2%. En su forma cis. De esta manera el presente trabajo establece en un modelo animal de Diabetes Mellitus de tipo1 que el aceite de semilla de capulín puede tener un efecto hipocolesterolemiante especifico en una dieta modificada, lo cual puede ser la base de tratamientos terapéuticos específicos para enfermedades con un componente metabólico como la Diabetes Mellitus.

Palabras clave: Nutraceuticos, *Prunus serotina*, Diabetes Mellitus de tipo 1.

INTRODUCCIÓN

El actual modelo económico impacta diferentes órdenes entre ellos el cultural y el patrón de conducta alimentaria, en donde México no está exento a esta dinámica mundial, una manera de monitorear el desarrollo de nuestro estado es por medio del Índice de Desarrollo Humano (IDH) de acuerdo a los datos obtenidos del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) el cual es un indicador donde se resumen los logros promedio en tres dimensiones: salud, educación e ingreso, el estado de Michoacán se encuentra en el lugar 29 de los 32 estados de la Republica con un valor de 0.700 de IDH en salud para el año 2012 en educación ocupamos la posición 30 así como el índice de desarrollo el lugar 26, se considera que cada una de estas dimensiones representa una capacidad fundamental necesaria para que las personas puedan disfrutar de una vida que consideren valiosa, existe un apartado en el análisis de IDH donde los estados se comparan con diferentes países en el mundo y por el nivel de salud, desarrollo y educación Michoacán es comparado con Suriname un país de Sudamérica colindante

con Brasil, siendo este uno de los principales problemas ya que nuestro modelo económico no es sustentable así como la educación en el estado ya que, en 2009 y 2013, Guanajuato fue el estado que más avanzó en educación secundaria y primaria; mientras tanto, Oaxaca y Michoacán muestra fallas graves encontrándose Michoacán en el lugar 31 de los 32 estados de la República Mexicana, la organización atribuye los niveles "graves" a que toda acción educativa, entre los procesos de certificación docentes "boicoteada", deduce que cualquier niña, niño o joven que viva en Michoacán se enfrenta a un "desalentador futuro educativo", por lo que le vendría mejor emigrar a otra entidad o apoyarse en el respaldo familiar para desarrollar su potencia, aunque no es el único motivo de migración ya que el bajo desarrollo hacen que las familias completas migren en busca de nuevas y mejores oportunidades en diferentes ámbitos, así como el acceso a la salud de manera equitativa, la oportunidad de tener una alimentación saludable, ya que en el país y en el estado no hay desnutridos, hay malnutridos lo que nos provoca tener una alta incidencia de enfermedades crónico degenerativas que podríamos prevenir (2).

Las enfermedades crónico-degenerativas son las principales causas de mortalidad en México, ubicándose en primer lugar la Diabetes Mellitus, en segundo las enfermedades isquémicas del corazón, en tercero las cerebro-vasculares, y en cuarto las crónicas del hígado. "Todos estos padecimientos, están muy relacionadas con la obesidad y con el síndrome metabólico". (Dra. Gloria Ruiz Guzmán, investigadora del Laboratorio de Investigación Clínico-Epidemiológica UAM).

El principal componente del síndrome metabólico es la obesidad central abdominal asociada con un patrón desfavorable del perfil de lípidos y alteraciones en el metabolismo de la glucosa, que se acompañan de un incremento en la incidencia de hipertensión arterial y Diabetes Mellitus tipo 2, enfermedad cardiovascular y cerebro-vascular (3).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados fueron obtenidos de *Rubus fruticosus* (Zarzamora) colectada en el municipio de Ziracuaretiro, la cual no cumplió las especificaciones de exportación. Se separó la fracción los sólidos y líquida, en este caso en que nos interesa en el sólido se seca a 47°C por 36 horas y se separó la semilla, se sometió a trituración, posteriormente el proceso para extraer los ácidos grasos por un método de extracción en este caso utilizamos en método de extracción Soxhlet, una vez obtenidos la fracción lípidica ácidos grasos se realiza un análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases o Resonancia Magnética Nuclear. Con el aceite obtenido se diseñó la dieta basada en la dieta estandar DIETA AIN-93G, para roedores, ratón *Mus musculus*, y se les adminsitró la dieta modificada a ratones inducidos a diabetes mellitus tipo 1 con la administración de estreptozocina a una concentración de 150 mg/Kg de peso, la administración de la dieta se realizó por 14 días al termino del tratamiento se determinaron los parámetros correspondientes a perfil de lípidos, como son colesterol total y triglicéridos en sangre de los animales tratados con la dieta modificada en base a los ácido grasos poliinsaturados provenientes de la semilla de *R. fruticosus*, los resultado se analizaron de manera estadística y se determinaron las desviaciones estándar correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez analizadas todas nuestras muestras, en sangre para Colesterol Total y Triglicéridos se obtuvieron los siguientes resultados.

En la Figura No. 1 se observa la concentración de colesterol total para el grupo de animales control inducidos con diabetes mellitus de tipo 1, sometidos a la dieta estandar AING-93 un valor de 164.5 mg/dl y una desviación estándar de ± 35.94, en el caso del grupo tratado con el dieta experimental con aceite de semilla de zarzamora y acidos grasos poliinsaturados se mostró una concentración de 60.44 mg/ dl y una deviación estándar de ± 7.59, para una N= 5, individuos, para cada tipo de tratamiento, por lo que se establece un diferencia significativa para el tratamiento dietético, en el caso de colesterol en los animales con diabetes mellitus de tipo 1 indicido con estreptozotocina.

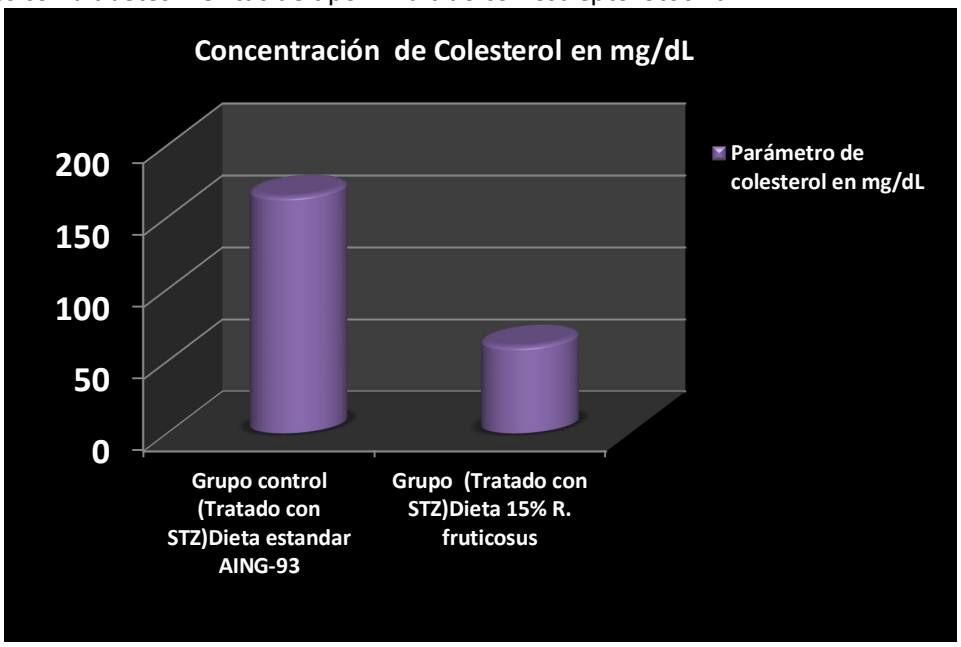
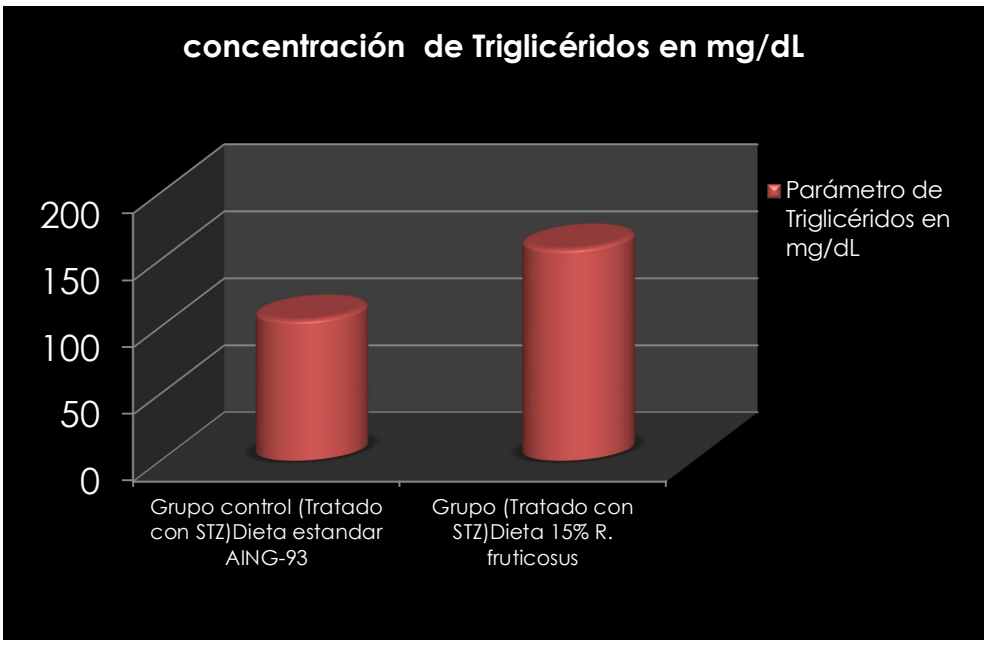


Figura 1. Concentración de Colesterol total en mg/dL, en suero de ratones de inducidos a Diabetes mellitus de tipo 1, con estreptozocina, dieta control y dieta modificada con acidos grasos poliinsatirados y fibra al 15%, proevenientes de la extracción y aislamiento de *R. fruticosus. N=5 individuos tratados para cada grupo*



En la Figura No. 2 se observa la concentración de trigliceridos para el grupo de animales control inducidos con diabetes mellitus de tipo 1, sometidos a la dieta estándar AING-93 un valor de 105.0 mg/dl y una desviación estándar de ± 21.35; en el caso del grupo tratado con el dieta experimental con aceite de semilla de zarzamora y ácidos grasos poliinsaturados mostraron una concentración de 157.91 mg/ dl y una deviación estándar de ± 61.25, para una N= 5, individuos, para cada tipo de tratamiento, por lo que se establece que no existe una diferencia significativa para el tratamiento dietético, en el caso de los triglicéridos en los animales con diabetes mellitus de tipo 1 inducido con estreptozotocina.

Tabla No. 1. Perfil lípidico en suero de ratones control y tratados con la dieta modificada con ácidos grasos poliinsaturados de semilla de *R. fruticosus*.

Tipo de Tratamiento	Parámetrode Colesterol en mg /dL	ParámetrodeTriglicéridos en mg /dL
Grupo Control (tratado conSTZ) DietaEstándar AING-93.	164.5 ±35.94 N=5	105.0 ±21.35 N=5
Grupo tratado con STZ, Dieta15% de fibra R. fruticosus.	60.44 ±7.59 N=5	157.91 ±61.125 N=5

CONCLUSIONES

Se observó una disminución significativa en la concentración de colesterol en los animales inducidos para Diabetes Mellitus de Tipo1, tratados con la dieta modificada al 4% de aceite proveniente *R. fruticosus* y 15% de fibra proveniente de *R. futicosus*. No así una diferencia significativa en los valores de triglicéridos. Por lo que se puede establecer que existe un efecto hipocolesterolemiante especifico de la dieta modificada con ácidos grasos poliinsaturados prevenientes de semilla de *R. fruticosus* en un modelos de diabetes mellitus de tipo 1.

REFERENCIAS

[1] Corte Osorio L. Y,, Martínez Flores H.E, Ortiz Alvarado R. 2011. Effect of dietary fiber in the quantitative expression of butyrate receptor GPR43 in rats colon. Nutricion Hospitalaria.

[2] Financiera Nacional de Desarrollo Agropucuario, Rural, Forestal y pecuario. (Febrero 2015). Panorama de la Zarzamora. 2015, de Secretario de Hacienda y Crédito Público Sitio web: http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Zarzamora.pdf

[3] Rodolfo De la Torre García Cristina Rodríguez García. (Febrero 2015). Índice de Desarrollo Humano para las entidades federativas, México 2015. 2015, de Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo en México Sitio web: http://www.mx.undp.org/content/dam/mexico/docs/Publicaciones/PublicacionesReduccionPobreza/InformesDesarrolloHumano/PNUD_boletinIDH.pdf.

[4] Universia México. (2014). Enfermedades crónico-degenerativas: primera causa de mortalidad en México. 2014, de Universidad Autónoma Metropolitana Sitio web: http://www.cva.itesm.mx/biblioteca/pagina_con_formato_version_oct/apaweb.html.

[5] Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. J Physiol Pharmacol.

SERO-EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR TOXOPLASMA GONDII EN DONADORES DE SANGRE DEL ESTADO DE SONORA.

[1*]Pérez-Martínez, C.J., [1]Corella-Madueño, M.A.G., [1]Quizán-Plata, T., [1]Rascón-Careaga, A., [2]Alvarado-Esquivel, C., [3]Hernández-Tinoco, J., [3]Sánchez-Anguiano, L.F.

1. Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Boulevard Luis Encinas y Rosales S/N. 83000 Hermosillo, Sonora, México.
2. Laboratorio de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina y Nutrición. Universidad Juárez del Estado de Durango. Avenida Universidad S/N, 34000 Durango, DGO. México.
3. Instituto de Investigación Científica "Dr. Roberto Rivera-Damm", Universidad Juárez del Estado de Durango. Avenida Universidad S/N, 34000 Durango, DGO, México.

*Autor para correspondencia: Jhovanna.perez@unison.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria distribuida a nivel mundial. En México uno de cada cinco individuos inmunocompetentes presenta Toxoplasmosis aguda. Los gatos y otros felinos son el huésped definitivo del parásito (*Toxoplasma gondii*), siendo la principal fuente de infección para los seres humanos. A pesar de que la toxoplasmosis, se ha reportado como causa importante de morbilidad y mortalidad en diversos países; las pruebas de laboratorio para su detección no se realizan rutinariamente. En México, la epidemiología de la infección por *T. gondii* ha sido pobremente explorada. El presente estudio tiene por objetivo determinar la seroepidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en donadores de sangre del estado de Sonora. Utilizando un cuestionario validado, se obtuvieron los datos sociodemográficos y epidemiológicos de los participantes. El estudio clínico de las muestras sanguíneas se realizó evaluando 408 muestras de suero por ELISA para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-Toxoplasma gondii. Se obtuvo un total de 55 pacientes positivos para IgG (55/408, 13.5%) y 12 positivos para IgM (12/408, 2.94%; 12/55, 21.8%). La seroprevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en donadores de sangre en el estado de Sonora, se encuentra por debajo de la media nacional (28.0 - 43.1%).

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*; epidemiologia; seroprevalencia.

INTRODUCCIÓN

El parásito *Toxoplasma gondii* causa infecciones en todo el mundo [1]. La infección por T. gondii en humanos es generalmente asintomática y autolimitada [2]. Sin embargo, algunas personas pueden desarrollan manifestaciones clínicas de toxoplasmosis caracterizadas por la presencia de adenopatías, manifestaciones oculares y del sistema nervioso central [1-3]. La Toxoplasmosis es una enfermedad que ha sido descuidada en el país, debido a que ha sido fácil pasar desapercibido algo que causa impacto "esporádicamente". En 2014, México presentó 114 casos de Toxoplasmosis formalmente registrada según la Dirección General de Epidemiología (DGE), de los cuales 14 se presentaron en niños menores de cuatro años y 76 se presentaron entre 15 y 44 años, siendo Guerrero, Oaxaca y Campeche los estados

más afectados en ese orden [4]. Sin embargo, los portadores asintomáticos, son cuantiosos y se estima que alrededor de un tercio de la población mexicana ha sido expuesta al agente patógeno, en mayor proporción en los estados más necesitados y de clima más húmedos del país [4-5]. Éstos, sujetos representan potenciales víctimas y además vectores de la enfermedad.

Se estima que sólo uno de cada cinco individuos inmunocompetentes con Toxoplasmosis aguda, presenta sintomatología y posteriormente el parásito se enquista para generar la etapa crónica [6]. En este último caso, es importante la vigilancia de los pacientes susceptibles que en dado caso puedan desarrollar una reactivación de la infección *a posteriori*. Mientras que, en el primero, la relevancia estriba en que la transmisión por vía hematógena es posible en casos en que el donador curse una infección aguda y asintomática en el momento de la captación de sangre y por lo tanto existan taquizoítos en la unidad transfundida [7].

Ante la conocida posibilidad de transmisión de Toxoplasmosis por vía hematógena, es importante analizar la prevalencia y el riesgo de transmisión que existe en México en relación con este acto cotidiano en las instituciones de salud [8]. En este tema, nuestro país sigue a tientas, debido a la escasez de información que nos permita un panorama fiel del riesgo de transmisión de Toxoplasmosis por transfusión sanguínea [9-10].

El presente trabajo, es uno de los primeros estudios clínicos sobre seroprevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en donadores de sangre en el estado de Sonora, donde se evaluaron 408 muestras de suero por la técnica de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii*. El valor de la información obtenida de este estudio, además de imprescindible para los fines ya comentados; es novedosa e invaluable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de Estudio

Se llevó a cabo un estudio transversal, reclutando donadores en dos de los bancos de sangre más grandes del municipio de Hermosillo, Sonora, México: Banco de Sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social Zona No. 2 (IMSSZ2) y Centro Estatal de Transfusión Sanguínea del Estado de Sonora (CETS). La proporción de donadores captados fue de 3:1 (75% IMSSZ2 – 25% CETS) en ese orden. Ambos bancos de sangre son públicos y atienden regularmente a pacientes de clase media y baja.

El tamaño de la muestra (n) se determinó por medio del programa informático Epi Info 7 con una población de 15,000 personas, una prevalencia de 7.4% como referencia y un N.C. de 95%, resultando 287 personas.

Los criterios de inclusión para el reclutamiento de sujetos de estudio fueron (1) que los pacientes fueran donantes seleccionados, para lo cual debían cumplir con lo estipulado en la NOM-253-SSA1-2012 y (2) que decidieran participar voluntariamente en el estudio. Se le invitó a participar a cada uno de los pacientes en el protocolo de investigación, aclarando que no habría remuneración económica y explicándole verbalmente lo relativo al mismo. Si el paciente aceptaba participar, se le pedía firmar un consentimiento informado y posteriormente se le pedía que respondiera un cuestionario previamente validado para fines epidemiológicos [4].

Material Biológico

Los voluntarios se sometieron a la obtención de muestra de sangre por punción venosa en tubo sin aditivo. Las muestras fueron centrifugadas y separadas del paquete globular para almacenar el suero temporalmente a 4°C en el refrigerador del centro donde fue captado el donante. Posteriormente se transportaron en hielera con refrigerantes al Laboratorio de Análisis Clínicos y de Investigación de la Universidad de Sonora para su almacenamiento (– 20°C).

Las muestras fueron enviadas a la Universidad Juárez del Estado de Durango en hielera con refrigerantes para analizarse en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la misma institución.

Diseño Experimental

Posterior a la separación de suero y transporte al laboratorio, las muestras de suero de los sujetos de estudio, se evaluaron para la determinación de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* por el método de Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

Análisis de Muestras

Se evaluaron muestras de suero de 408 donadores de sangre voluntarios con un kit comercial de ELISA de la marca Diagnostic Automation, Inc. (Woodland Hills, CA, USA), para la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG e IgM. La casa comercial que produce el material de análisis es una empresa certificada por la Food and Drugs Administration (FDA) y las ISO 9001:2008 y 13485:2003. Las determinaciones se llevaron a cabo según las especificaciones del fabricante.

Para el análisis de IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii*, se determinaron factores denominados índice Toxo G e índice Toxo M, respectivamente. Éstos se calcularon para cada determinación, dividiendo el valor medio de cada muestra entre el valor medio del punto de corte del calibrador. Se consideraron positivas para IgG e IgM, aquellas muestras que tuviesen índices IgG e IgM mayor o igual que 1.0 (>8 IU/ml).

Análisis Estadístico

El análisis de datos recabados en el cuestionario realizado a los donadores, se analizó con el mismo paquete estadístico antes mencionado. Se utilizaron estadísticos descriptivos para variables numéricas (media y mediana) y categóricas (frecuencia o porcentaje). Además, para comparación de frecuencias entre grupos se utilizó el Test de Mantel-Haenszel y el Test Exacto de Fisher (cuando el número de celdas fue < 5). En el caso de variables ordinales, se utilizó Chi cuadrada para medir la tendencia.

Se llevaron a cabo análisis bivariado y multivariado con el fin de evaluar la asociación entre las características de los pacientes y la exposición a *T. gondii*. Como criterio de exclusión para el análisis multivariado, se consideraron variables resultantes del análisis bivariado con $p \leq 2$. Se calculó Razón de Probabilidad (Odd Ratio = O.R.) y un 95% de Intervalo de Confianza (I.C.) por medio del análisis multivariado, utilizando múltiple regresión logística incondicional. Se consideraron valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos y por lo tanto se establecieron dichas variables como relacionadas con la exposición al parásito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Muestras

Después de realizar el análisis de anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii* para cada paciente, se determinó un total de 55 pacientes positivos para IgG (55/408, 13.5%) y de éstos, 12 positivos para IgM (12/408, 2.94%; 12/55, 21.8%). El resultado se compara con los de otros estudios semejantes, lo cual se muestra en la Figura 1.

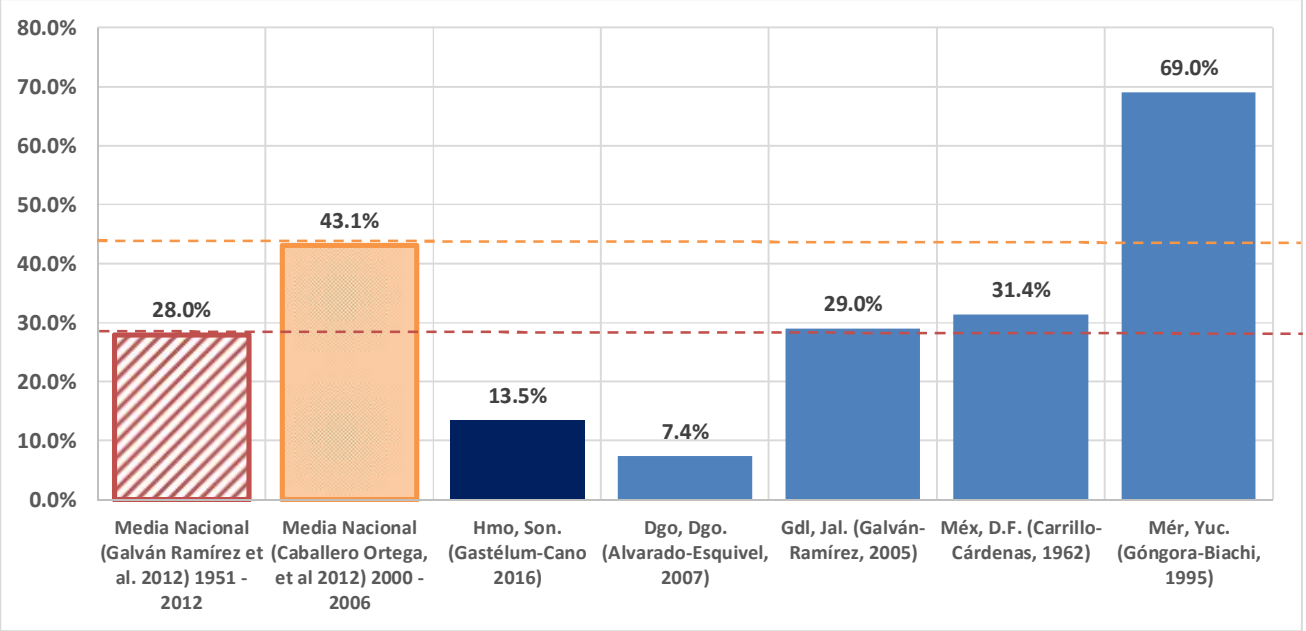


Figura 1. Comparación de seroprevalencia en donadores de sangre en la ciudad de Hermosillo, con respecto a los obtenidos por otros estudios similares.

Análisis Estadístico

De los 408 donadores de sangre estudiados se obtuvo una media muestral de 31.77 ± 9.52 y un intervalo desde 18 – 60 años de edad.

El análisis multivariado de los datos sociodemográficos y de hábitos de los donadores de sangre seropositivos, mostraron que la seropositividad a *T. gondii* estuvo asociada con la edad (OR = 1.74; 95% IC: 1.03 – 2.94; P = 0.03), y al consumo de tabaco (OR = 2.09; 95% IC: 1.02 – 4.29; P = 0.04). En mujeres, se encontró una correlación entre la seropositividad a *T. gondii* con el número de embarazos, parto y cesáreas. Las variables de edad, ausencia de gatos en las cercanías y el consumo de carne de pavo, mostró asociación con la positividad a IgM.

CONCLUSIONES

La seroprevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* hallada en donadores de sangre de la ciudad de Hermosillo, México efectivamente se encuentra por debajo de la media nacional fijada por Galván-Ramírez (2012) [11]. No obstante, los factores de riesgo de la población de donadores de sangre de

dicha ciudad fueron el hábito de fumar tabaco, la edad y el consumo de carne de pavo. Por otra parte, la presencia de gatos cerca del lugar de residencia, no representó un factor de riesgo.

En virtud de que no se encontró otro factor de riesgo relacionado con las condiciones sociodemográficas y de higiene de la población, se acepta la hipótesis de trabajo de que dichas condiciones de la población de donadores de sangre de Hermosillo, contribuyen a la baja seroprevalencia con respecto a la media nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]. D. E. Hill, S. Chirukandoth, J. P. Dubey, "Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals". *Anim Health Res Rev*. Vol. 6, no.1. pp. 41-61, 2005.

[2]. M. Maenz, D. Schlüter, O. Liesenfeld, G. Schares, U. Gross, U. Pleyer, "Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease". *Prog Retin Eye Res*. Vol. 39, pp. 77-106, 2014.

[3]. L. M. Weiss, J. P. Dubey, "Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol". Vol. 39, no.8, pp. 895-901, 2009.

[4]. C. Alvarado Esquivel, M. F. Mercado Suarez, A. Rodriguez Briones, L. Fallad Torres, J. O. Ayala Ayala, L. J. Nevarez Piedra, E. Duran Morales, S. Estrada Martínez,O. Liesenfeld, J. A. Marquez Conde, S. A. Martinez Garcia, "Seroepidemiology of infection with Toxoplasma gondii in healthy blood donors of Durango, Mexico". *BMC Infect Dis*. Vol. 7, pp. 75-82, 2007.

[5]. J. G. Montoya, O. Liesenfeld, "Toxoplasmosis". Lancet. Vol. 363, pp.1965-1976, 2004.

[6]. O. Velasco Castrejón, B. Salvatierra Izaba, J. L. Valdespino, A. M. Sedano Lara, S. Galindo Virgen, C. Magos, A. Llausás, R. Tapia Conyer, G. Gutiérrez, J. Sepúlveda, "Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico". Salud Pública Mex. Vol. 34, no. 2, pp. 222-229, 2004.

[7]. K. S. Pereira, R. M. Franco, D. A. Leal, "Transmission of toxoplasmosis (Toxoplasma gondii) by foods". Adv Food Nutr Res. Vol. 60, pp.1-19, 2010.

[8]. T. Y. Chiang, H. H. Hsieh, M. C. Kuo, K. T. Chiu, W. C. Lin, C. K. Fan, C. T. Fang, D. D. Ji. "Seroepidemiology of Toxoplasma gondii Infection among healthy blood donors in Taiwan". PLoS One. Vol. 7, no. 10. pp. 48139, 2010.

[9]. Y. Sukthana, A. Mahittikorn, H. Wickert, S. Tansuphaswasdikul, "A promising diagnostic tool for toxoplasmic encephalitis: tachyzoite/bradyzoite stage-specific RT-PCR". Int. J. Infect. Dis., Vol. 16, no. 4, pp. 279-284, 2012.

[10]. B. Sarkari, R. Shafiei, M. Zare, S. Sohrabpour, L. Kasraian, "Seroprevalence and molecular diagnosis of Toxoplasma gondii infection among blood donors in southern Iran". J Infect Dev Ctries. Vol. 8, no. 4, 543-547, 2014.

[11]. M. A. Galván Ramírez, R. Troyo, S. Román, C. Calvillo Sánchez, R. M. Bernal Redondo, "A systematic review and meta-analysis of Toxoplasma gondii infection among the Mexican population". Parasites & Vectors., Vol. 5, no. 1, pp. 271 – 283, 2012.

HOMOLOGÍA DE NRF2 HUMANA (FACTOR NUCLEAR-2, DERIVADO DE ERITROIDES 2) EN MAMÍFEROS SUPERIORES. [HOMOLOGY OF NRF2 HUMAN (NUCLEAR FACTOR-2, DERIVED FROM ERYTHROID 2) IN HIGHER MAMMALS].

[1*]Vite-Mejía, F.J., y [1,2]Brena-Becerril, A.

1 Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 N° 595 carretera Tlajomulco – Santa Fe, Lomas de Tejeda, Tlajomulco Jalisco.
2 Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Jalisco. Plantel 16, Km 3.2 Carretera a San Isidro Mazatepec. Santa Cruz de las Flores, Tlajomulco de Zúñiga, Jal. CP45640.

*Autor para correspondencia: fridavitee@hotmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

ABSTRACT
The nuclear factor-2, derived from erythroid 2 (NRF2) encodes a transcription factor that is a member of a small family of proteins of basic leucine zipper (bZIP). The transcription factor encoded regulates genes that contain antioxidant response element (ARE) in their promoters; Many of these genes encode proteins involved in the response to injury and inflammation that includes the production of free radicals. Have been characterized transcription multiple variants that encode different isoforms for this gene. The Nrf2 protein could lead to new therapies to combat or treat neurodegenerative diseases (such as Parkinson's, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or Huntington's disease) due to the fact that restores the levels of the proteins that cause diseases reconducing them to normal, healthy levels, which prevents cell death. In this work, the aim is to obtain and to relate the NRF2 with mammalian protein homologous to the NRF2 Human, in order to build relationships with them by means of bioinformatic analysis programs. Protein homologies presented the analysis of 63 different sequences gathered from the database NCBI, their multiple alignments, patterns, preserved and the construction of a tree of maximum similarity in BioEdit showing its possible relation to the NRF2 human.

RESUMEN
La Factor nuclear-2, derivado de eritroides 2 (NRF2) codifica un factor de transcripción que es un miembro de una pequeña familia de proteínas de cremallera de leucina básicas (bZIP). El factor de transcripción codificado regula genes que contienen elementos antioxidantes de respuesta (ARE) en sus promotores; Muchos de estos genes codifican proteínas implicadas en la respuesta a lesiones e inflamación que incluye la producción de radicales libres. Se han caracterizado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen. La proteína Nrf2 podría conducir a nuevas terapias para combatir o tratar las enfermedades neurodegenerativas (como el Parkinson, el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o la enfermedad de Huntington) debido a que restaura los niveles de las proteínas que causan las enfermedades reconduciéndolos a unos niveles normales y sanos, lo que evita la muerte celular. En este trabajo lo que se pretende es obtener y relacionar la proteína NRF2 con mamíferos homólogos a la NRF2 Humana, con el fin de generar interrelaciones con ellas por medio de análisis en programas bioinformáticos. Presento homologías proteicas del análisis de 63 secuencias distintas reunidas de la base de datos NCBI, sus alineamientos múltiples, patrones

conservados y la construcción de un Árbol de máxima similitud en BioEdit que muestre su posible relación con la NRF2 humana.

Palabras clave: Factor nuclear-2, derivado de eritroides 2, Enfermedades Neurodegenerativas.

INTRODUCCIÓN

La Factor nuclear-2, derivado de eritroides 2 (NRF2) codifica un factor de transcripción que es un miembro de una pequeña familia de proteínas de cremallera de leucina básicas (bZIP) [3]. El factor de transcripción codificado regula genes que contienen elementos antioxidantes de respuesta (ARE) en sus promotores; Muchos de estos genes codifican proteínas implicadas en la respuesta a lesiones e inflamación que incluye la producción de radicales libres. Se han caracterizado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen [1].

Un conjunto de científicos del Gladstone Institutes en San Francisco (Estados Unidos) identificaron que la proteína Nrf2 podría conducir a nuevas terapias para combatir o tratar las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o la enfermedad de Huntington. Este tipo de enfermedades se debe a un comportamiento anómalo de las proteínas en el cerebro, que se pliegan de manera incorrecta y provocan su acumulación en las neuronas, lo que inflige daño a las células e incluso llega a destruirlas [4] [5].

Los científicos que realizaron el mismo estudio han empleado la molécula Nrf2 para restaurar los niveles de las proteínas que causan las enfermedades neurodegenerativas, reconduciéndolos a unos niveles normales y sanos, lo que evita la muerte celular [5].

El factor de transcripción codificado regula los genes que contienen elementos de respuesta antioxidante (ARE) en sus promotores; Muchos de estos genes codifican proteínas implicadas en la respuesta a lesiones e inflamación que incluye la producción de radicales libres [1] [2].

Hasta ahora se sabe que la NRF2 es parte de un grupo de factores de transcripción llamados receptores nucleares. Se activa bajo condiciones de estrés oxidativo y posteriormente activa varios genes y proteínas antioxidantes. La activación de esta proteína se ha utilizado para accidentes cerebro vasculares, junto con la eriodictimol-7-O-glucósido (E7G) que está directamente asociada con su neuro protección frente a la lesión isquémica inducida por el estrés oxidativo [1].

En este trabajo mostramos los resultados de análisis filo proteicos de 63 secuencias homólogas distintas de NRF2 pertenecientes a eucariotas, se encontró que la NRF2 humana presenta homologías principalmente en primates, Murciélagos, Ballenas, Roedores, Delfines, Focas y Morsas, Gato doméstico, Félidos, Camellos, Jabalí, Ovinos y Osos, algunos otros con homologías más alejadas como peces.

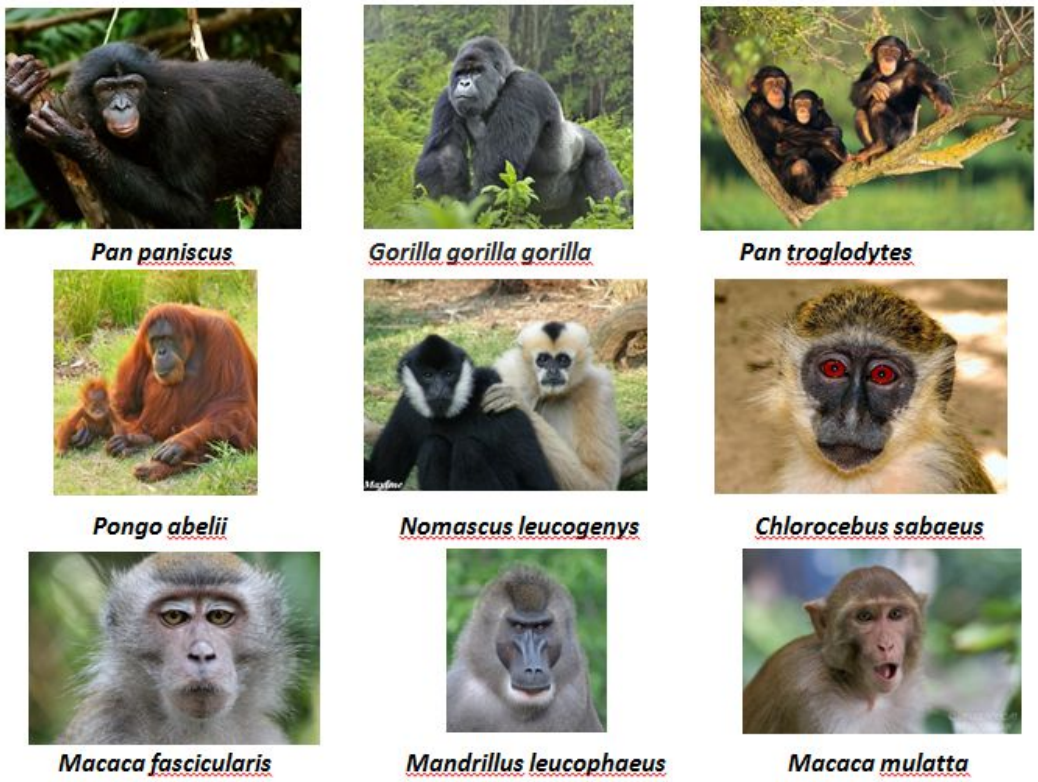
MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis se desarrolló por medio de Programas Bioinformáticos. El método fue encontrar una sonda característica de la proteína NRF2 perteneciente al Humano (Homo sapiens) en el National Center For Biotechnology Information (NCBI), y por medio de los algoritmos BLASTP y PSI-BLAST obtener una colección de secuencias, que permita encontrar proteínas homologas y seleccionar a mamíferos con

relaciones a ella. Y con base a la colección obtenida obtener las áreas conservadas y realizar alineamientos en Clustal X y BIOEDIT para posteriormente construir Árboles generados en ClustalX, BioEdit y Mega 4 que los interrelacione con la NRF2 humana. Finalmente el árbol que se eligió fue el de Máxima Similitud de Proteínas en BioEdit debido a que presento mejores características a comparación de los demás.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo una colección de 63 secuencias homólogas que representan especies del mismo orden pertenecientes a eucariotas, se encontró que la NRF2 humana presenta homologías principalmente en primates de hasta un 100-91% de similitud (*Pan paniscus, Gorilla gorilla, Pan troglodytes, Pongo abelii, Nomascus leucogenys, Chlorocebus sabaeus*, etc.) [Figura 1] que como ya se sabe los seres humanos y los primates compartimos características físicas similares y hasta un 97-99% de nuestros genes; pero también se encontró similitud en otros mamíferos taxonómicamente lejanos al ser humano pero que presentan homologías de un 92-89% a la NRF2 humana como lo son algunos Murciélagos (*Galeopterus variegatus, Rhinolophus sinicus,* etc), Ballenas (*Balaenoptera acutorostrata scammoni, Orcinus orca,* etc), Roedores (como ratas y ardillas), Delfines , Focas y Morsas, Gato Doméstico, Felinos (como Guepardos, Tigres), Camellos, Jabalí, Ovinos(vaca, cabra) y Osos, algunos otros con homologías más alejadas como peces (*Oncorhynchus kisutch y Danio rerio*) [Figura 2].



Los resultados obtenidos mediante la búsqueda fueron verificados realizando un remuestreo inverso mediante las mismas sondas utilizadas con los algoritmos BLASTP y PSIBLAST, confirmando la consistencia de la selección.



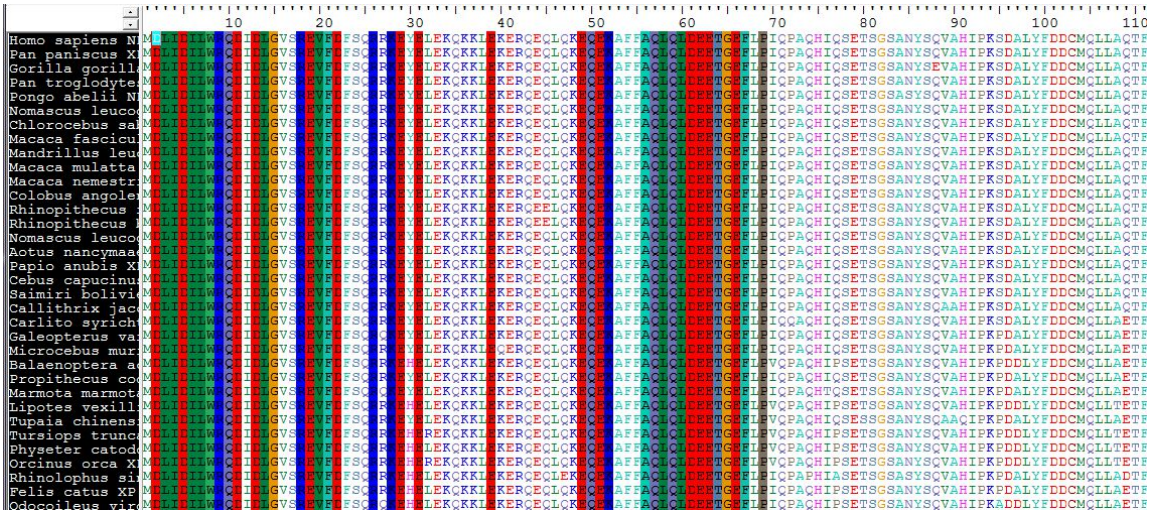
Oncorhynchus kisutch ***(Salmón del pacifico)***

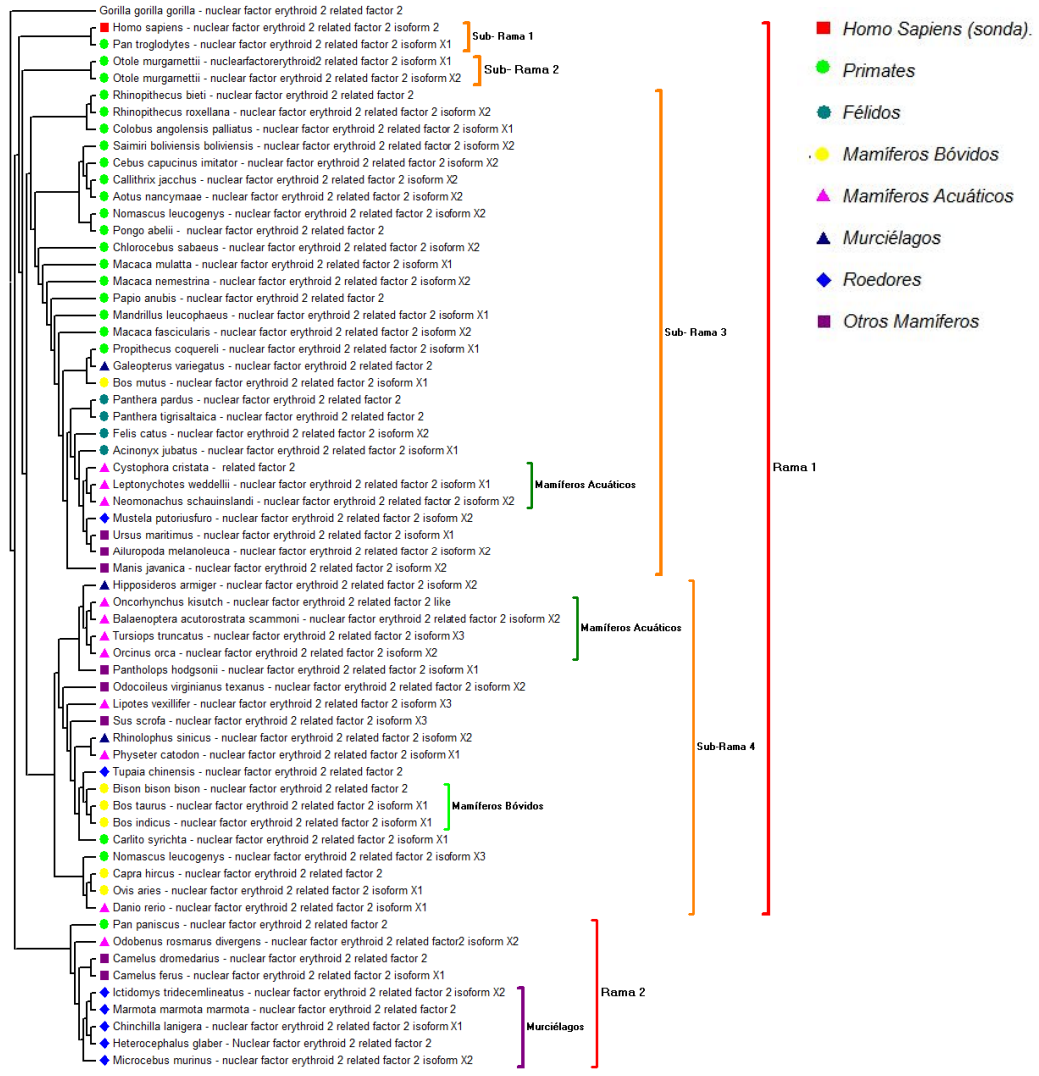
Danio rerio ***(Pez cebra)***

El árbol filoproteico obtenido fue clasificado de acuerdo a la taxonomía de los mamíferos obtenidos en el BLASTP, de acuerdo con lo mencionado fue clasificado en Primates, Mamíferos Acuáticos, Roedores, Murciélagos, Mamíferos Bóvidos, Otros Mamíferos y el más importante el Homo Sapiens que aunque se encuentra taxonómicamente similar a los primates se clasifico de esta forma para identificar como nuestra sonda elegida comparte mayor o menor similitud en las ramificaciones con las demás clasificaciones, además de poder identificarla con mayor facilidad [Figura 4].

El árbol filoproteico de máxima verosimilitud organizó a las secuencias en dos ramas principales. La rama principal está conformada inicialmente por nuestra sonda NRF2 *Homo sapiens* y ella es quien conecta a la mayor parte de las especies seleccionadas anteriormente en NCBI, esta rama además de subdivide en 4 ramificaciones más, en donde la sub-rama 1,2 y parte de la 3 está conformada por la mayor parte de Primates, algunos Félidos, Mamíferos Acuáticos y algunos otros como *Ursus maritimus, Ailuropoda melanoleuca* y *Manis javanica.* En la sub-rama 4 se haya una gran Diversidad de mamíferos que taxonómicamente difieren unos de otros, se encuentran desde Murciélagos, principalmente el *Hipposideros armiger* una especie proveniente del sur de China e India que es quien conforma esta rama y presenta relación tanto con Mamíferos Acuáticos, Bóvidos, algunos Primates y Otros mamíferos.
La segunda Rama está conformada principalmente por Murciélagos, Camellos, *Odobenus rosmarus divergens* y el Primate *Pan paniscus*.

También se agregó un alineamiento múltiple de la colección de las 63 secuencias con el fin de encontrar sitios conservados. El análisis realizado en BioEdit revelo sitios conservados en forma de columnas parsimoniosas en la totalidad de las secuencias.




Gorilla gorilla gorilla - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Homo sapiens - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform 2
Pan troglodytes - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Sub- Rama 1
Otole murgarnettii - nuclearfactorerythroid2 related factor 2 isoform X1
Otole murgarnettii - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Sub- Rama 2
Rhinopithecus bieti - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Rhinopithecus roxellana - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Colobus angolensis palliatus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Saimiri boliviensis boliviensis - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Cebus capucinus imitator - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Callithrix jacchus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Aotus nancymaae - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Nomascus leucogenys - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Pongo abelii - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Chlorocebus sabaeus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Macaca mulatta - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Macaca nemestrina - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Papio anubis - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Mandrillus leucophaeus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Macaca fascicularis - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Propithecus coquereli - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Galeopterus variegatus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Bos mutus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Panthera pardus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Panthera tigrisaltaica - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Felis catus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Acinonyx jubatus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Cystophora cristata - related factor 2
Leptonychotes weddellii - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Neomonachus schauinslandi - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Mamíferos Acuáticos
Sub- Rama 3
Mustela putoriusfuro - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Ursus maritimus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Ailuropoda melanoleuca - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Manis javanica - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Hipposideros armiger - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Oncorhynchus kisutch - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 like
Balaenoptera acutorostrata scammoni - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Tursiops truncatus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X3
Orcinus orca - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Mamíferos Acuáticos
Pantholops hodgsonii - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Odocoileus virginianus texanus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Lipotes vexillifer - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X3
Sus scrofa - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X3
Rhinolophus sinicus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Physeter catodon - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Tupaia chinensis - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Bison bison bison - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Bos taurus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Bos indicus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Mamíferos Bóvidos
Sub-Rama 4
Carlito syrichta - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Nomascus leucogenys - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X3
Capra hircus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Ovis aries - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Danio rerio - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Rama 1
Pan paniscus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Odobenus rosmarus divergens - nuclear factor erythroid 2 related factor2 isoform X2
Camelus dromedarius - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Camelus ferus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Ictidomys tridecemlineatus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Marmota marmota marmota - nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Chinchilla lanigera - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X1
Heterocephalus glaber - Nuclear factor erythroid 2 related factor 2
Microcebus murinus - nuclear factor erythroid 2 related factor 2 isoform X2
Murciélagos
Rama 2
Homo Sapiens (sonda).
Primates
Félidos
Mamíferos Bóvidos
Mamíferos Acuáticos
Murciélagos
Roedores
Otros Mamíferos

DISCUSIÓN

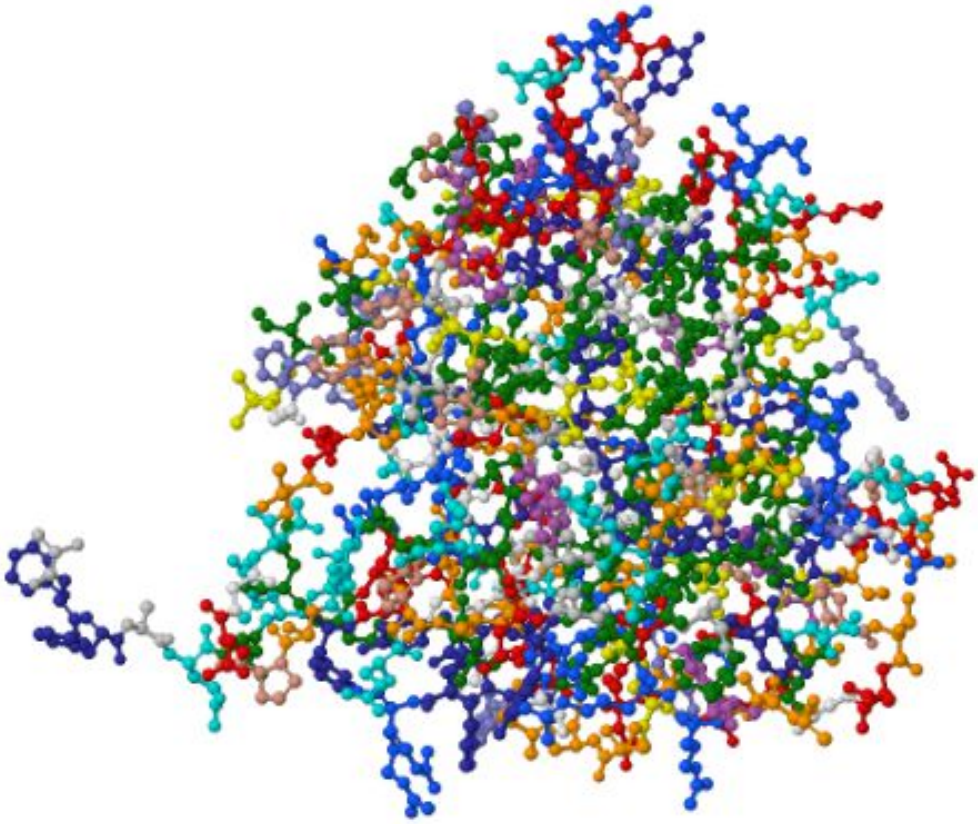
En el árbol de Máxima Similitud de Proteínas la primer rama se subdivido en cuatro ramas, en la primer sub-rama nos muestra que esta proteína en *Homo sapiens* y *Pan Troglodytes* tienen un distancia evolutiva técnicamente igual y esto se debe a que *Pan Troglodytes* es un Chimpancé común de África tropical que es el pariente vivo más cercano al ser humano, además es importante mencionar que la secuencia de *Gorilla gorilla gorilla* no se encontró dentro de las ramas obtenidas en el árbol filoproteico pero se conecta a la primer rama, esto puede deberse a que quizás la composición y estructura de su molécula o su sitio activo difiere de las demás especies por lo tanto la aísla de ellas.

La primer rama se subdivido en tres ramas más, en la sub-rama 3 se obtuvo que además de estar conformada principalmente por Primates, de ellas descienden más sub-ramas que enlazan a otras especímenes taxonómicamente muy lejanas a los primates pero que presentan relaciones análogas, es decir, que tienen relación funcionalmente pero no presentan un antecesor común, la sub-rama 4 presento las mismas características de las sub-rama 3 presenta relaciones análogas.

En la Rama 2 se encontró que la especie *Pan paniscus* al parecer presenta una cercanía mucho mayor con algunos Murciélagos; se sabe que el 98% de su ADN del *Pan Paniscus* es idéntico al del *Homo sapiens* y posiblemente con esta asociación se pueda sustituir o transferir esta Proteína en el Ser Humano.

El alineamiento que se obtuvo posiblemente muestre que los sitios conservados sean el sitio activo de la Proteína NRF2 humana.

Por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la búsqueda con los algoritmos BLASTP y PSIBLAST de nuestra sonda NRF2 Humana los Primates son los mamíferos que presentan mayor similitud de esta proteína, y quizá se deba a que compartimos tanto características físicas similares como hasta un 97-99% de nuestros genes, pero refiriéndonos a otros mamíferos también presento similitud a otros que están taxonómicamente muy alejados a el ser humano, lo que nos indica que probablemente estos mamíferos pueden ser un método de obtención de esta proteína e incluso el uso de estos mamíferos para someterlos a estudios neuronales, para buscar alternativas y lograr activar esta proteína y combatir las Enfermedades Neurodegenerativas que presenta el ser humano.



CONCLUSIONES

El árbol filoproteico obtenido confirma la asociación que tiene la Proteína NRF2 humana con otros mamíferos y no solo terrestres también acuáticos y taxonómicamente no muy cercanos a ella y con una revisión bibliográfica e investigación profunda se puede comprobar su presunta función y poder sugerir con mayores fundamentos algún mecanismo de posible sustitución o transferencia de estas moléculas en el ser humano para combatir estas Enfermedades Neurodegenerativas.

Quizás sus relaciones tanto cercanas como lejanas abren la interrogante sobre las relaciones evolutivas y funcionales entre las distintas isoformas de la NRF2 y cuya actividad está en función del patrón activo de ella.

REFERENCIAS

[1] Jing X, Ren D, Wei X, Shi H, Zhang X, Perez RG, Lou H, Lou H (2013). *Eriodictyol-7-O-glucoside activates Nrf2 and protects against cerebral ischemic injury.* Toxicol Appl Pharmacol. Dec 15;273(3):672-9.

[2] Gill BS, Kumar S, Navgeet (2017). *Ganoderic acid targeting nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in lung cancer. Tumour Biol.* Mar; 39(3) PMID 28349780.

[3] Mina Königsberg Fainstein (2007). Nrf2: *LA HISTORIA DE UN NUEVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN QUE RESPONDE A ESTRÉS OXIDATIVO*. REB 26(1): 18-25.

[4] Asociación Española de ELA (2017). *La Nrf2: una proteína que puede ser clave para tratar trastornos degenerativos.* España. Recuperado de: http://adelaweb.org/la-nrf2-una-proteina-que-puede-ser-clave-para-tratar-trastornos-degenerativos

[5] HERALDO (2016). *Identifican una proteína que puede ser clave para tratar trastornos neurodegenerativos.* Europa press. Madrid. Recuperado de: http://www.heraldo.es/noticias/suplementos/salud/2016/12/27/hallan-una-proteina-clave-para-tratar-los-trastornos-neurodegenerativos-1150370-1381024.html

ANÁLISIS DE TEMPERATURAS ÓPTIMAS DE EXPRESIÓN EN ESCHERICHIA COLI DE TRES CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS (VNAR/TB) PARA DIAGNOSTICOS IN SITU.

[1]Miranda-Astiazarán, E., [1]Nuño-Ayala, J.L., [1]Perez-Padilla, N.A., [1]Nuño-Ayala, A., [2]Villafaña-Rojas, J., [3]Licea-Navarro, A.F., y [1*]Lugo-Fabres, P.H.

1. Unima Diagnósticos de México S de RL de CV, Zapopan, de los mosqueteros, México 45110
2. Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG), Zapopan, México 45129
3. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, México 22860.

*Autor para correspondencia: pavel.lugo@unima.com.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La producción de proteínas recombinantes con fines de diagnóstico está teniendo un avance importante para el desarrollo de pruebas rápidas de detección de tuberculosis (TB). Para ello se requiere una producción de proteínas heterólogas de manera eficiente y rápida. Entre los muchos sistemas disponibles para la producción de proteínas heterólogas, la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli BL21 DE3* (BL21) sigue siendo uno de los huéspedes más atractivos debido a el extenso conocimiento que se tiene sobre su genética y fisiología [1]. Se realizaron una serie de fermentaciones de cada construcción (TB1, TB2 Y TB3) a una temperatura optima de crecimiento celular (37°C), al llegar a una densidad óptima para la expresión de proteínas recombinantes (5-6 OD600) se indujeron mediante IPTG. Se evaluaron tres temperaturas para la expresión de estas proteínas (25°C, 30°C y 37°C), debido a que la temperatura óptima de crecimiento de BL21 puede variar a la temperatura óptima de expresión. Se realizó un análisis comparativo entre tres diferentes temperaturas de producción de las fermentaciones realizadas de todas las construcciones en el cual se demuestra el impacto de la temperatura en la expresión de proteínas al inducir las células a la misma densidad óptica (5-6 OD600).

Palabras clave: Dominio sencillo; Expresión; IPTG; Bioproceso.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de enfermedades utilizando proteínas recombinantes actualmente ha tomado un papel relevante en el área de la tecnología farmacéutica y en particular para el diagnóstico de tuberculosis (TB). El uso de proteínas recombinantes ha permitido el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico que son superiores a las pruebas convencionales que actualmente existen en el mercado que son lentas, tienen baja especificidad y pueden ser muy costosas, como el caso de aislamiento de *M. tuberculosis*, amplificación medida por transcripción, amplificación de ADN por varias técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en ingles), biopsia del paciente, análisis en el aumento de la adenosina deaminasa, entre otras [2]–[4]. Muchas de las pruebas de diagnóstico rápido actuales se basan en anticuerpos convencionales derivados de murinos para la detección de patógenos o moléculas derivadas de ellos, no obstante, los anticuerpos monoclonales (mAbs por sus siglas en inglés) tienen una variedad de características que los hacen particularmente adecuados para este tipo de tarea, tales

como; mayor especificidad, alta afinidad por su antígeno diana y mayor pureza. A pesar de estas características favorables, las pruebas diagnósticas basadas en dichos anticuerpos pueden verse afectadas negativamente por altas temperaturas o por almacenamiento durante largos períodos en condiciones de alta humedad [5].

El desarrollo de nuevas tecnologías ha resultado en pruebas que permiten diagnosticar enfermedades de una manera más rápida, con mayor sensibilidad y especificidad y en el punto de cuidado, permitiendo detectar la enfermedad inclusive en etapas tempranas de infección, de tal manera que se logre dar un diagnóstico correcto, más acertado, de una manera menos invasiva y más sencilla [6]. Se han desarrollado pruebas de diagnóstico para TB que usan proteínas recombinantes y que les otorgan ventajas sobre las convencionales debido a que no requieren una cadena en frio para su uso, el resultado es más rápido y con menos margen de error ya que son capaces de detectar las diferentes etapas de la enfermedad mediante la interacción con anticuerpos presentes en la sangre y son más resistentes a condiciones extremas como es las altas temperaturas [6].

La producción de proteínas recombinantes se realiza generalmente mediante sistemas biológicos bien caracterizados tanto genéticamente como fisiológicamente. Entre muchos de estos sistemas disponibles la bacteria *Escherichia coli BL21 DE3* (BL21) es uno de los anfitriones más atractivos [7], [8]. Se pueden encontrar diversos métodos para lograr obtener una sobre producción de proteínas en este sistema biológico, donde ya se han establecido protocolos que van desde un nivel experimental hasta una escala industrial para diferentes tipos de proteínas recombinantes provenientes de diferentes hospederos [9].

Es posible producir proteínas eucariotas a nivel experimental (50 mL de medio) mediante el uso de *BL21* cultivada en un medio mínimo para la expresión de proteínas recombinantes a una densidad celular alta (10-20 OD_{600}), y obteniendo rendimientos altos (14-25 mg/50 ml de cultivo). En este artículo se menciona la importancia de diversos factores que influyen en la eficiencia de producción, como son: La selección de la cepa huésped, selección del plásmido y su promotor, la estabilidad del ARNm y la optimización de la traducción de los codones, mejorando significativamente los rendimientos de expresión de las proteínas eucariotas [10]. Debido a los factores mencionados, es viable implementar la metodología utilizada en protocolos de ya establecidos para el desarrollo de un protocolo de producción que sea capaz de optimizar la expresión de proteínas en comparación a lo ya establecido, debido a que se maneja una construcción relativamente nueva (vNAR), para la cual no se han analizado a fondo métodos para optimizar la expresión en este tipo de proteínas. El protocolo que actualmente se utiliza para la producción de proteínas recombinantes para diagnóstico en Unima se basa en una fermentación en lote de *BL21* sin el manejo de un medio mínimo, en donde se reportan rendimientos bajos (0.1 mg/ 50 mL de medio) en comparación a los obtenidos con el manejo de una alta densidad celular en un medio de expresión [10].

Para este trabajo de investigación se propone generar un nuevo protocolo de producción basado en la metodología mencionada que propone Sivashanmugam [10] que se adapte a las necesidades del sector privado. Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizará BL21, debido a que el genoma de esta cepa en específico ha sido caracterizado extensivamente y hay disponibilidad de un gran número de vectores para expresión, esta cepa también es deficiente en proteasas, permitiendo obtener un alto rendimiento de proteínas y por defecto lograr disminuir los costos de producción [11]–[13].

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular con medio SB

Se realizó una serie de fermentaciones de BL21 en matraces de 250 mL (3 por construcción) con 50 mL de medio super broth (SB) en donde se crecieron 3 construcciones diferentes (TB1, TB2 Y TB3), partiendo de un pre-inoculo equivalente al 1 % del volumen total, todas con el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones iniciales: temperatura de 37 °C y 300 rpm en una incubadora orbital con temperatura controlada.

Inducción

Los cultivos celulares se dejaron creciendo hasta que estos lleguen a una densidad óptica óptima para su inducción (0.5-0.7 OD_{600}) con los parámetros de crecimiento ya mencionados. Una vez alcanzado el rango óptimo de densidad óptica, se indujeron los cultivos con 0.1 mL de IPTG 0.5 M cada uno, como se muestra en la figura 1.

Expresión

Una vez inducidas las células, se ajustó la temperatura de incubación a las 3 diferentes temperaturas de expresión propuestas (25, 30 y 37 °C) para cada una de las 3 construcciones mencionadas, por un lapso mínimo de 5 horas de expresión de proteína recombinante como se muestra en la figura 1.

Extracción

Una vez finalizado el periodo de expresión se procedió a la extracción de proteínas recombinantes. Se centrifugo el medio de cultivo durante 20 minutos a 4500 G a 15 °C y se decantó el medio de cultivo. Posteriormente se realizó un lisado celular por choque osmótico, utilizando 3 mL por cada gramo de peso húmedo de pellet de buffer de lisis (D-Dextrosa 20% p/v, EDTA 1mM Y Tris HCL 50 mM), se re suspendieron las células por vortex y se dejó incubar las células durante 20 minutos a 4 °C con agitación cada 10 minutos, se volvió a centrifugar las células durante 20 minutos a 4500 G a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se agregó en una relación de 1.2 mL de una solución de sulfato de magnesio 5 mM y se volvió a re suspender las células, incubándolas a 4 °C durante 20min con agitación cada 10 minutos. Se centrifugaron las células a 10,000 G durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante complementando con el mismo volumen obtenido con buffer de equilibrio (Imidazol 10 mM, fosfato de sodio 50 mM y NaCl 300 mM).

Purificación

Posteriormente cada solución de proteínas extraídas se pasó por una columna cromatografía por afinidad a metales (IMAC por sus siglas en inglés) de 1.5 volumen de resina His60 Ni Superflow Clontech (1 volumen equivale a 1.5 mL) previamente equilibrada con 10 volúmenes de buffer de equilibrio, pasándose 3 veces a un flujo de goteo por gravedad. Posteriormente se lavó la columna con de buffer de lavado (Imidazol 40 mM, fosfato de sodio 50 mM y NaCl 300 mM) y se eluyó la columna mediante 10 mL de buffer de elución (Imidazol 300 mM, fosfato de sodio 50 mM y NaCl 300 mM) recolectando la proteína eluida en tubos eppendorf de 2 mL y se determinó la concentración de proteína en cada tubo mediante la lectura de la muestra a 280 nm con un espectrofotómetro como se muestra en la figura 1.

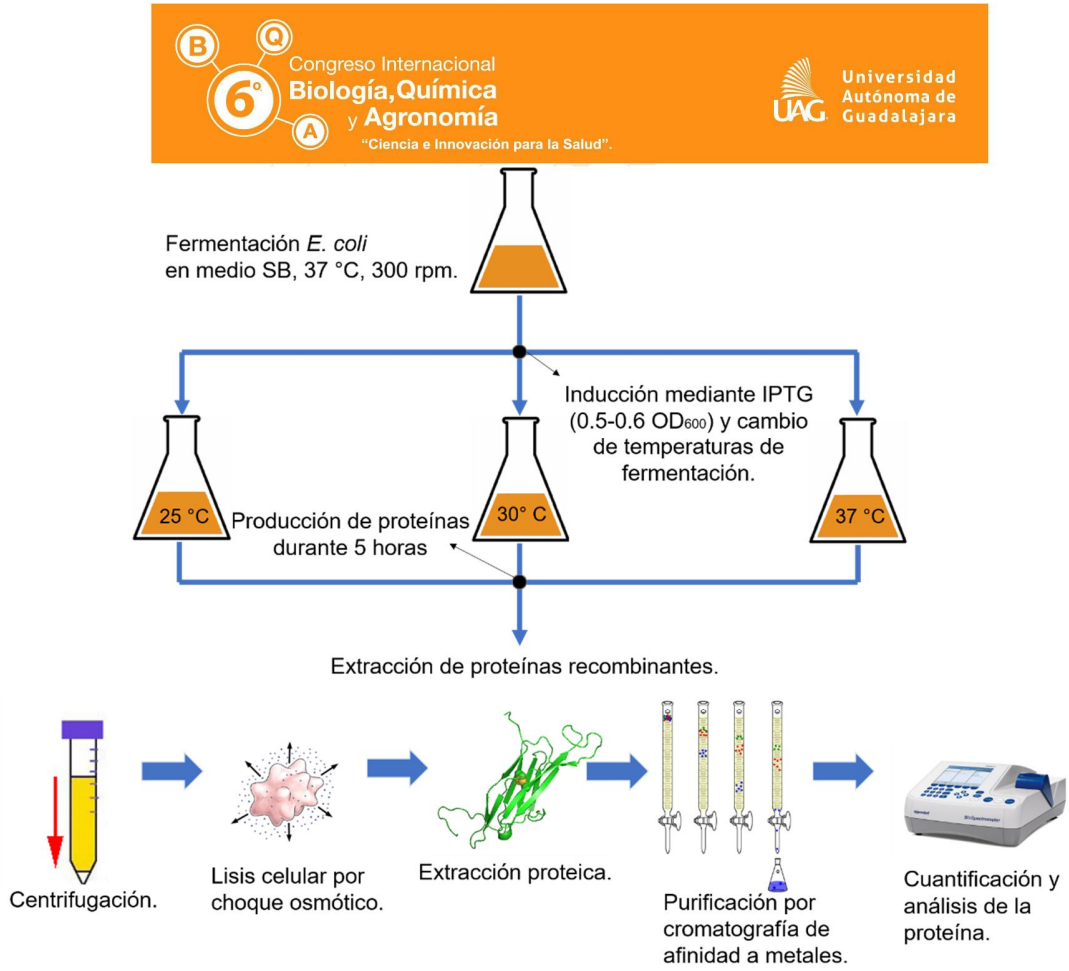


Figura 1: Ilustración de la metodología a seguir en el trabajo, para la optimización de la temperatura de producción de proteínas recombinantes en *BL21* (Imagen propia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un análisis comparativo entre tres diferentes temperaturas de producción de las fermentaciones realizadas de todas las construcciones, en el cual se corrió la elución con mayor concentración de las diferentes temperaturas; en la Figura 2 se muestra un gel de poliacrilamida de las tres construcciones, esto para verificar si realmente la temperatura influye en la expresión de proteínas al inducir las células a la misma densidad óptica (5-6 OD_{600}) lo cual se graficó en cuanto al rendimiento obtenido se refiere (Figura 3).

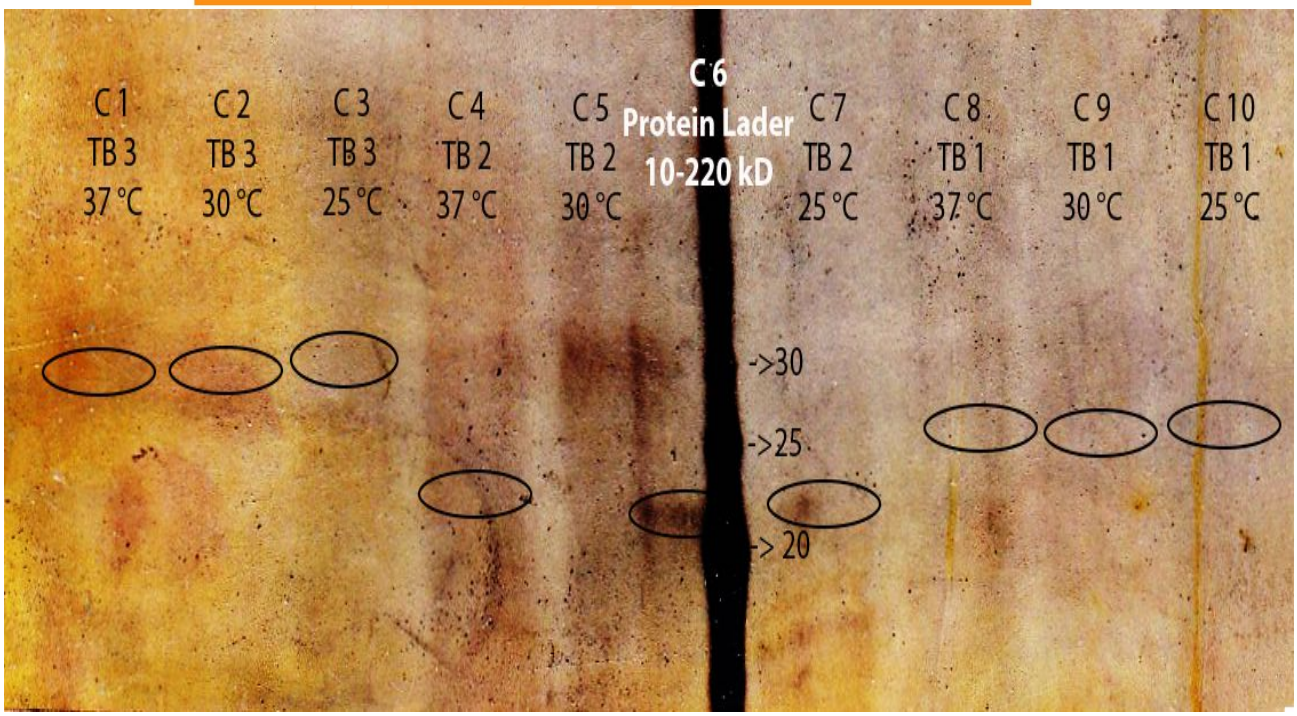


Fig 2. Gel de poliacrilamida tincion de nitrato de plata. C1, C2 y C3: 100 µl precipitados de TB3 de 30 KDa de las diferentes temperaturas de expresión. C4, C5 y C7: TB2 de 22 KDa en las diferentes temperaturas de expresión, se puede apreciar tres bandas. C8, C9 y C10: Se corrio TB1 26 KDa en las diferentes temperaturas de expresión.

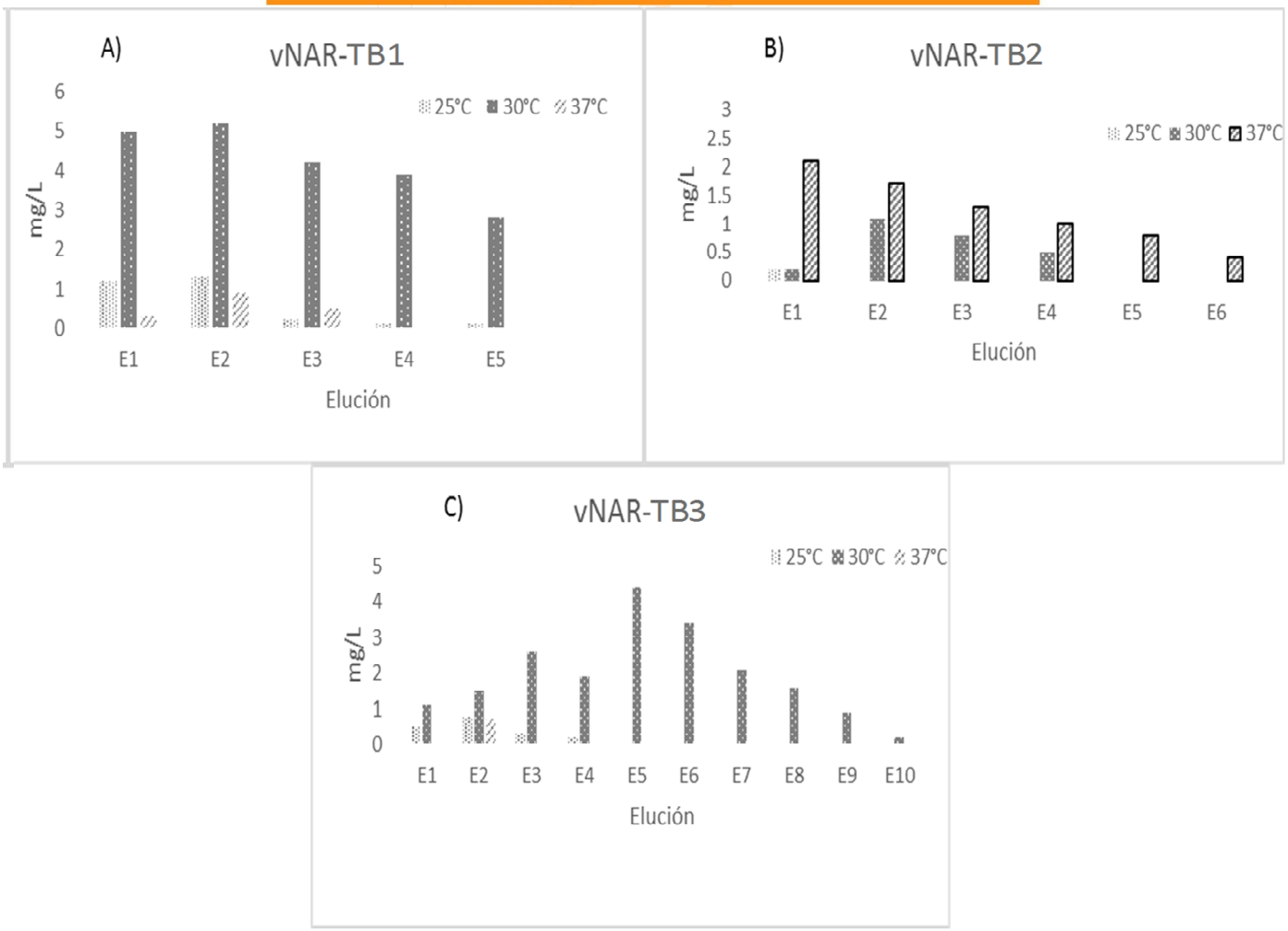


Fig 3 Correlación de temperaturas y expreción de proteínas. A) mayor concentración en elución 2 a 30° C con rendimiento de 5.2 mg/L vNAR-TB1. B) La mayor concentración es de 2.1 mg/L de la construcción vNAR-TB2 en la elusion 1 a una temperatura de 37° C. La elución 5 a 30° C temperatura de produccion tuvo un rendimiento de 4.4 mg/L de la construcción vNAR-TB3.

CONCLUSIONES

Se logró encontrar las temperaturas óptimas de producción en la concentración de proteínas recombinantes en las diferentes temperaturas de expresión de las tres construcciones, especialmente en vNAR-TB1 y vNAR-TB3 con una variación > 3 mg/L, obteniendo la mayor cantidad de proteína recombinante obtenida en la temperatura de 30 °C en las dos construcciones y se obtuvo una ligera variación en las diferentes temperaturas (> 1 mg/L a 37 °C) en la construcción vNAR-TB2.

Se alcanza a observar una variación significativa en concentración de proteína a diferentes temperaturas de expresión, lo que conlleva a un ajuste al protocolo estándar de producción de proteínas recombinantes, logrando su optimización en el rendimiento de las fermentaciones.

Debido que a en la literatura se pueden encontrar producciones de hasta 25 mg/L de proteínas de tipo eucariotas mediante la utilización del sistema biológico de BL21 con el empleo de alta densidad celular

(5-10 OD_{600}) con un medio mínimo [7], [10], [14], es factible complementar este trabajo con la utilización de estos métodos para lograr una producción que se asemeje a estos resultados. Sin embargo las referencias citadas anteriormente no contemplan fragmentos de anticuerpos ricos en enlaces disulfuro, por lo cual quedara a manera de perspectiva analizar comparativamente los rendimientos de las moléculas del presente trabajo y estandares de proteínas semejantes.

REFERENCIAS

[1] J. Shiloach and R. Fass, "Growing E. coli to high cell density - A historical perspective on method development," *Biotechnol. Adv.*, vol. 23, no. 5, pp. 345–357, 2005.

[2] G. Ferrara *et al.*, "Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis : a prospective study," *Lancet*, vol. 367, pp. 1328–1334, 2006.

[3] W. Arciniegas and D. L. Orjuela, "Tuberculosis extrapulmonar : revisión de 102 casos en el Hospital Universitario San Jorge de Pereira , 2000-2004," *Biomédica*, vol. 71, no. 19, pp. 71–80, 2006.

[4] D. C. Ortiz Marín and B. H. Aristizábal, "Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis," *Med. U.P.B*, vol. 32, no. 2, pp. 144–150, 2013.

[5] C. K. Murray, R. A. Gasser, A. J. Magill, and R. S. Miller, "Update on Rapid Diagnostic Testing for Malaria," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 97–110, 2008.

[6] World Health Organization, "Laboratory-based evaluation of 19 commercially available rapid diagnostic tests for tuberculosis," *UNDP/World Bank/WHO Spec. Program. Res. Train. Trop. Dis.*, pp. 1–80, 2008.

[7] J. R. Swartz, "Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 12, pp. 195–201, 2001.

[8] L. Hewitt and J. M. Mcdonnell, "Screening and Optimizing Protein Production in E . coli," *Mol Biol*, vol. 278, pp. 1–16, 2004.

[9] S. C. Makrides, "Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli †," *Microbiol. Rev.*, vol. 60, no. 3, pp. 512–538, 1996.

[10] A. Sivashanmugam, V. Murray, C. Cui, Y. Zhang, J. Wang, and Q. Li, "Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli," *Protein Sci.*, vol. 18, no. 1, pp. 936–948, 2009.

[11] S. Jana and J. K. Deb, "Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 67, pp. 289–298, 2005.

[12] W. Peti and R. Page, "Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost," *Protein Expr. Purif.*, vol. 51, pp. 1–10, 2007.

[13] N. T. Perna *et al.*, "Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 : H7," *Nature*, vol. 409, no. January, pp. 529–533, 2001.

[14] G. C. Sriram Srinivasan and and T. U. G. Barnard, "A Novel High-Cell-Density Protein Expression System Based on Ralstonia eutropha," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 12, pp. 5925–5932, 2002.

POTENCIAL ANTIMICROBIANO COMBINADO DE EXTRACTOS DE TRES PLANTAS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN LA PIEL.

[1*]Martínez-Baso, R.J., [2]Ríos, N. y [2]Montañez, D.

1. Universidad de Panamá, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.
2. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Panamá.

*Autor para correspondencia: ramymartonez1009@gmail.com.

Área del conocimiento Química Farmacobiológica.

RESUMEN

En observaciones realizadas acerca de las infecciones dermatológicas en distintos laboratorios especializados de Panamá y a partir de una exhaustiva revisión bibliográfica se encontró que las enfermedades dermatológicas muestran síntomas drásticos que generalmente requieren tratamientos por largo tiempo. Como es generalmente conocido el potencial antimicrobiano y antimicótico que poseen muchas plantas, sugerimos experimentar con extractos de algunas plantas seleccionadas como: *Gliricidia sepium, Rosmanirus officinalis, Aloe* vera preparando algunos extractos con diferentes concentraciones, para combatir las infecciones bacterianas y micóticas de la piel.

Se esperaba que la acción sinergística de estos extractos evaluados, combinados en diferentes proporciones (loción) mejorara la actividad antifúngica, antiséptica y antibacteriana de los mismos. Para comprobar esto se realizaron bioensayos antimicrobianos "in vitro" con cepas tipo ATCC (American Type Cepa Culture) como: *Streptococcus oralis, Staphylococcus aureus, Esherichia coli, Psaeudumona auriginosa* y los hongos: *Fusarium proliferatum, Aspergillus brasiliensis, Candida, sp*. Como control se emplearon productos dermatológicos comerciales. Al comparar los resultados obtenidos con los de productos comerciales, se pudo determinar que la loción posee actividad antimicrobiana como se esperaba. En conclusión este proyecto destaca la importancia del estudio y conservación de las plantas en pro del desarrollo de la medicina actual y el gran valor que poseen para la búsqueda de nuevas sustancias con potencial antimicrobiano.

Palabras clave: Antimicrobiano; antimicótico; dermatológico*; Gliricidia sepium; Rosmanirus officinalis; Aloe vera.*

REFERENCIAS

[1] Sereiti, M.R, Abu,KM, Sena,P. 1999. Pharmacology of rosemary Rosmarinus officinalis Linn. and its therapeutic potentials. . 2016, de Nisceir On line Periodicals Repository Sitio web: http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/18973

[2] Dominguez, R.N, Arzate, I, Chanona, J.J, Welti, J.S, Alvarado, J.S, Calderon, G., Garibay, V, Gutierrez, G.F. 2012. Aloe vera. Revista Mexicana de Ingeniería Química , 11 N°1, 1-2.

[3] LaRocco MT, Burgert SJ. 1997. Fungal infections in the transplant recipient and laboratory methods for diagnosis. Rev Iberoam Micol 14: 143-146.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA DE ADULTOS SENSIBILIZADOS Y NO SENSIBILIZADOS DE LA CIUDAD DE HERMOSILLO, SONORA.

[1]*Corella-Madueño, M.A.G., [1]Rascón-Careaga, A., [1]Quizán-Plata, T., [1]Pérez-Martínez, C.J., [1]Zubiate-Cabanillas, G., [1]Lozano-Aviles, J.C., [2]Martínez-Robinson, K.G.

1. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Bvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.
2. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km 6. Hermosillo, Sonora México.

*Autor para correspondencia: lcorella@guayacan.uson.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La adopción de un patrón alimentario occidentalizado, caracterizado por mayores cantidades de alimentos procesados, conlleva al consumo inadecuado de nutrientes esenciales para el sistema inmunológico. Un ejemplo de ello son los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6, factores inmunomoduladores en severo desequilibrio debido al consumo excesivo de omega-6 y muy poco omega-3, promoviendo la aparición de enfermedades alérgicas en la población mundial. El objetivo del presente trabajo es: comparar los niveles eritrocitarios de ácidos grasos omega-6 y omega-3 de adultos con sensibilización alérgica y controles aparentemente sanos en Hermosillo, Sonora. Para la determinación de sensibilización alérgica se utilizó el fluoroinmunoensayo enzimático Phadiatop® (ImmunoCAP 100®). Se determinó a su vez el perfil de ácidos grasos en los eritrocitos, mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID). La prevalencia de sensibilización alérgica fue del 40%, que concuerda con la estimada por la Organización Mundial de las Alergias, WAO (siglas en inglés). Los individuos sensibilizados exhibieron mayores cifras de eosinófilos y neutrófilos en sangre periférica. Así mismo, la proporción de ácido linoleico y ácido α-linolénico en sus eritrocitos fue superior. Evidentemente los ácidos grasos esenciales; linoleico y α-linolénico; tienen acción inmunomoduladora durante el desarrollo de enfermedades alérgicas.

Palabras clave: Ácidos grasos; enfermedad alérgica; inflamación, membrana eritrocitaria.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3; α-linolénico (ALA), eicosapentaenóico (EPA) y docosahexaenóico (DHA), son nutrientes esenciales para la supervivencia de los seres humanos; los obtenemos a partir de nuestra dieta, debido a que carecemos de la maquinaria enzimática necesaria para sintetizarlos [1]. Podemos encontrarlos principalmente, en alimentos de origen marino como pescados y mariscos, pero también en algas. Se ha observado que en regiones donde la población tiene una dieta rica en AG-ω3, tanto la incidencia como la severidad de enfermedades inflamatorias es menor que en zonas con dietas menos ricas en estos [2].

El ser humano es capaz de sintetizar todos los AG que necesita, con la excepción de 2: el ácido linoleico (LA) y el ácido α-linolénico (ALA), ω-6 y ω-3, respectivamente; y por esta razón son denominados AG esenciales [3]. Los demás miembros de la familia ω-6 pueden producirse a partir de LA, el cual es obtenido a partir de aceites vegetales como el de soya, maíz o cártamo, cereales, granos enteros y grasa de origen animal. De forma análoga, ALA sirve como materia prima para la producción de los demás AGPI ω-3, siendo frecuente en vegetales de hojas verdes y semillas de linaza [1]. La conversión de estos AG en los demás miembros de su respectiva familia ocurre principalmente en el hígado, por medio de una serie de reacciones catalizadas por las enzimas Δ^6-desaturasa, elongasa y Δ^5-desaturasa.

En una enfermedad inflamatoria, aguda o crónica, la respuesta inmune del individuo está fuera de control, es exacerbada y sumamente destructiva para su organismo. Ejemplos de estos padecimientos son: Artritis reumatoide, Lupus eritematoso sistémico, Diabetes mellitus tipo 1 y las Enfermedades alérgicas (EA) [4]. En el presente trabajo se hará énfasis en éstas últimas.

Una persona con EA es sensible hacia un determinado alergeno. La exposición a este alergeno (polen, hongos, ácaros, etc.) desencadena una respuesta inmune rápida y agresiva [5].

La prevalencia de enfermedades alérgicas mediadas por IgE (EA), ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas [6]. La Organización mundial de la Salud estima que cerca de una tercera parte de la población mundial sufre de al menos una forma de EA [7], convirtiendo a las enfermedades alérgicas en las más frecuentes en humanos [8]. Las EA tienen un trasfondo muy complejo donde factores genéticos y ambientales juegan roles activos en su desarrollo [9], [10]. En los últimos años, se ha puesto atención a los factores nutricionales [9] principales en la patogénesis y severidad de la alergia [11], [12]. Las dietas modernas altamente procesadas están ligadas al consumo inadecuado de factores inmunomodulatorios, como ácidos grasos poliinsaturados omega 6 y 3 [13], [1].

Los AG-ω3, tienen un papel modulador en la respuesta inmune, mediante tres mecanismos principales: 1) inducen o inhiben la síntesis de mediadores químicos (eicosanoides, óxido nítrico y citocinas), 2) disminuyen la síntesis de proteínas de adhesión celular (ICAM-1, FLA-1, MHC-2, etc.) y 3) modifican cascadas de señalización y se unen a factores de transcripción, con lo cual inducen la expresión o supresión de genes [14]. De esta manera, los AG-ω3, mejoran la calidad de vida de las personas con EA y enfermedades inflamatorias, son potenciadores de las terapias contra estos padecimientos y elevan la esperanza de vida.

OBJETIVO

Comparar los niveles eritrocitarios de ácidos grasos omega 6 y omega 3 de adultos con sensibilización alérgica y controles aparentemente sanos de la ciudad de Hermosillo, Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El presente trabajo es un estudio transversal, analítico prospectivo, de casos y controles. El tipo de muestreo utilizado fue no probabilístico por conveniencia. El mismo forma parte del "mega proyecto" titulado: "Estatus de Ácidos Grasos Omega-3 como Indicador Predictivo de la Severidad de la Inmunoreacción Alérgica de una Población Sensibilizada", desarrollado por el grupo de investigación "Biomedicina, Química y Nutrición" de la Universidad de Sonora.

Toma y Procesamiento de Muestras

La extracción muestras sanguíneas fue llevada a cabo por personal capacitado en punción venosa. Se extrajeron 20 mL de muestra repartidos en 4 tubos: 2 tubos sin aditivos (tapón rojo) a partir de los cuales se obtuvo suero para realizar la química sanguínea y el fluoroinmunoensayo Phadiatop®, y 2 con el anticoagulante EDTA (tapón lila), uno de los cuales se destinó para la realización de una citometría hemática con diferencial y el otro para la determinación del perfil de ácidos grasos por CG-FID. También se tomaron muestras de heces para realizar un estudio coproparasitoscópico seriado, empleando la técnica de concentración por sedimentación Ritchie con el fin de buscar parásitos con migración visceral que pudieran afectar los resultados.

Análisis de Ácidos Grasos

El análisis del perfil de ácidos grasos en eritrocitos, es una herramienta que permite estimar la proporción de ácidos grasos ω-6 y ω-3 en los tejidos del organismo humano [15]. Esta metodología consta de 3 pasos: 1) síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés), 2) el análisis por CG-FID y 3) el cálculo de los parámetros relacionados con la proporción de ácidos grasos presentes en la muestra.

Primero, las alícuotas de eritrocitos almacenadas a -80°C, fueron colocadas en un congelador a -20°C, por un periodo de 2 horas. Luego de esto, las muestras se colocaron en refrigeración, de 3 a 4°C, hasta que se descongelaron. Este proceso, fue realizado para evitar que la muestra sufriera cambios bruscos en la temperatura, que pudieran alterar su estabilidad.

En tubos con tapón de rosca se colocaron 2 mL de hexano frio (3 a 4°C) y el mismo volumen del complejo BF_3-CH_3OH (Trifluoruro de boro metanólico) al 14% p/v, a la misma temperatura. Los tubos de reacción se mantuvieron en refrigeración hasta el momento en que la muestra fue añadida, para evitar la descomposición del reactivo BF_3, en ácido bórico.
Se prepararon ésteres metílicos de AG (FAMEs) llevando a cabo una reacción de derivatización en medio ácido, utilizando para ello el complejo trifluoruro de boro-metanol como donador de grupo metilo. Este reactivo fue seleccionado con base a las recomendaciones de la norma ISO 12966-2:2011 "Animal and vegetable fats and oils -- Gas chromatography of fatty acid methyl esters -- Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids" [16].

Una vez generados los FAMEs, las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama de la marca Agilent Technology, modelo 6890N network GC System, con autoinyector. La fase estacionaria de la columna está conformada por cianopropil-metilpolisiloxano, la cual fue diseñada para la separación de FAMEs. Como gas acarreador se utilizó helio.

Para la correcta identificación de los ácidos grasos presentes en las muestras, se compararon los tiempos de retención de cada señal obtenida en el cromatograma, con el tiempo de retención de un estándar comercial de nombre 37 FAME Mix™, de la marca Supelco, el cual contiene una mezcla de 37 ácidos grasos de entre 4 y 24 carbonos; saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Una vez identificados las señales, se determinó la proporción (%) de cada ácido graso presente en la muestra utilizando el programa Excel 2013.

Examen de Sensibilización

Para la detección de sensibilización alérgica, se realizó el test cualitativo Phadiatop®, en el equipo automatizado ImmunoCAP 100®. Este método tiene una sensibilidad del 93% y una especificidad del 89% y es considerado un test válido como primer escalón para confirmar o excluir la presencia de sensibilización mediada por IgE.

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con el programa SPSS 20, IBM 2012. Se utilizaron medidas de tendencia central (media y promedio) para resumir los valores de las variables cuantitativas. Por su parte, las variables cualitativas se resumen en forma de frecuencias (porcentaje) con respecto a la población general o a cada uno de los grupos. Se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre los grupos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Bioquímico, Citometría Hemática y Coproparasitoscópico.

El análisis bioquímico y la citometría hemática fueron realizados para evaluar el estado de salud general de los individuos, con base en los resultados de este análisis se seleccionó a los participantes (Tabla I). La población seleccionada es "aparentemente sana". El análisis coproparasitoscópico no mostró parásitos con migración visceral que interfirieran con el estudio de sensibilización alérgica.

Sensibilización Alérgica

La sensibilización alérgica fue determinada mediante el test cualitativo Phadiatop®, el cual permite detectar la presencia de anticuerpos IgE específicos frente a un panel de alergenos comunes. Los resultados obtenidos indican que del total de la población estudiada (65 individuos), 26 (40%), presentan sensibilización alérgica; es decir la prueba Phadiatop® resultó positiva para los alergenos contenidos en el panel (TABLA I).

Tabla I. Análisis bioquímico y sensibilización alérgica de los grupos de estudio

	Sensibilizados (n=26)	No sensibilizados (n=39)	*p*
Glucosa (mg/dL)	84 ± 7.5	88±7.4	0.598
Urea (mg/dL)	26.4 ± 4.4	23.1±5.4	0.375
Ácido úrico (mg/dL)	4.2 ± 2.0	3.53±1.0	0.628
Creatinina (mg/dL)	0.9 ± 0.25	0.7±0.2	0.439
Colesterol (mg/dL)	138 ± 18.0	149±32	0.421
Triglicéridos (mg/dL)	74 ± 12.6	84±62	0.381
Eritrocitos (M/µL)	4.78 ± 0.5	4.76±0.4	0.916
Hemoglobina (g/dL)	13.7 ± 1.5	14.1±1.7	0.618
Hematocrito (%)	42.8 ± 4.0	44±4.6	0.547
VCM (fL)	88.6 ± 3.56	92.6±3.7	0.728
HCM (g/dL)	32 ± 1.04	31.9±0.8	0.643
RDW (%)	13 ± 0.4	13.4±0.6	0.493
Leucocitos (K/µL)	5.4 ± 2.0	4.37±0.4	0.283

Basófilos	54 ± 20	45±38	0.317
Eosinófilos	180 ± 37	130±16	0.03
Banda	310 ± 67	274±89	0.301
Neutrófilos	3297 ± 523	2119±151	0.02
Linfocitos	1772 ± 722	1498±391	0.355
Monocitos	350 ± 127	304±74	0.237
Plaquetas	239 ± 103	257±30	0.862
VPM	9.8 ± 1.3	9.5±0.6	0.741

VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, VPM: volumen plaquetario medio.

Perfil de Ácidos Grasos

En la tabla II se muestran los 19 ácidos grasos seleccionados para realizar el análisis del perfil de ácidos grasos, con su respectivo tiempo de retención. El principal criterio de selección fue: que el ácido graso seleccionado estuviera presente en la mayor cantidad de muestras posibles. Las muestras que presentaron menor o mayor variedad de ácidos grasos, fueron excluidas del análisis. Concretamente, 1 de las muestras presentó una mayor variedad de ácidos grasos y 2 muestras más ostentaron una variedad inferior al resto.

En contraste con lo esperado, y con lo reportado en la literatura [9], no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de ácidos grasos ω-6 y ω-3 de los grupos de estudio. Esto puede deberse a varios factores, tales como: el tamaño reducido de la muestra o lo estricto de los criterios de inclusión y exclusión, que pudieron haber propiciado la formación de una población extremadamente homogénea, al tipo de alimentación de los individuos [15].

Tabla II. Ácidos grasos incluidos en el análisis.

	Ácido Graso	Nombre	Tiempo de Retención
1	C14:0	Ac. Mirístico	10.932
2	C16:0	Ac. Palmítico	12.179
3	C16:1 n-7	Ac. Palmitoleico	12.872
4	C18:0	Ac. Esteárico	13.632
5	C18:1 n-9t	Ac. Elaídico	13.779
6	C18:1 n-9	Ac. Oleico	13.887
7	C18:2 n-6	LA (ácido linoleico)	14.343
8	C20:0	Ac. Araquídico	15.181
9	C18:3 n-6	Ac. Gamma-linolénico	15.447
10	C20:1 n-9	Ac. Z-11-eicosenóico	15.665

11	C18:3 n-3	ALA (ácido α-linolénico)	15.8
12	C20:2 n-6	Ac. Z-11-,Z-14-eicosadienóico	16.45
13	C20:3 n-6	Ac. Dihomo-gamma-linolénico	16.869
14	C20:4 n-6	Ac. Araquidónico	17.16
15	C20:5 n-3	EPA (ácido eicosapentaenóico)	20.578
16	C22:4 n-6	Ac. Docosatetranóico	20.887
17	C22:5 n-6	Ac. Docosapentanóico	21.528
18	C22:5 n-3	Ac. Docosapentanóico	22.021
19	C24:6 n-3	DHA (ácido docosahexaenóico)	22.415

Adicional al perfil de ácidos grasos, se determinó una serie de parámetros relacionados con el estatus de ácidos grasos, en el cual se presenta una perspectiva global de las diversas clases y familias de ácidos grasos presentes en las muestras analizadas. En la tabla III, se muestra la comparación de los parámetros de ácidos grasos calculados a partir del perfil de ácidos grasos.

El hallazgo más destacable en este apartado es la diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de LA/ALA. Los individuos sensibilizados presentaron un valor superior al de los individuos no sensibilizados (41.02 y 36.49, respectivamente. p= 0.04). Este resultado es relevante porque es consistente con lo propuesto por Black y Sharpe en la hipótesis de los ácidos grasos. En esta hipótesis se especula que el alto consumo de LA, característica notable de la dieta moderna occidentalizada, contribuye al establecimiento de alergia, mediante la preparación de las condiciones necesarias para su desarrollo [17] Presentando, en ambos grupos, un resultado desfavorable.

Tabla III. Parámetros de ácidos grasos.

Parámetro	Grupo		p
	No sensibilizado	Sensibilizado	
% AGS	44.23	43.12	0.239
% AGMI	16.27	15.43	0.345
% AGPI	39.67	41.45	0.284
% AGAI	25.02	26.33	0.306
% omega 6	30.41	30.94	0.627
% omega 3	9.27	10.52	0.198
LA/ALA	36.49	41.02	0.04
AA/EPA	4.42	4.16	0.266
Índice de n-3	7.04	8.09	0.201
n-6/n-3	3.43	3.06	0.243

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGAI: ácidos grasos altamente insaturados, LA: ácido linoleico, ALA: ácido alfa-linolenico, AA: ácido araquidónico, EPA, ácido eicosapentaenoico.

El parámetro LA/ALA, indica que los individuos sensibilizados consumen cantidades superiores de LA en comparación con los individuos no sensibilizados. Esto se debe a que el LA proviene única y exclusivamente de fuentes alimentarias, como lo son los aceites de origen vegetal y las comidas rápidas [18]. No obstante, los individuos no sensibilizados no presentan una proporción óptima, la cual debiera ser cercana a 2 [6].

Una dieta rica en LA, implica que éste se acumule en grandes cantidades en los depósitos tisulares [19] tal como se observa en los sujetos de ambos grupos de estudio, los cuales presentan un alto porcentaje de LA en sus eritrocitos. Esto provoca que la eficiencia de la cascada de desaturación/elongación disminuya, y por adición, la formación de EPA y DHA a partir del ALA [20]. La disfunción es tal que, el ALA ingerido, es desviado casi exclusivamente a β-oxidación, dando como resultado, bajos niveles de ácidos grasos n-3 en general y de ALA en particular [21]. Este efecto es consistente con los resultados del estudio, pues los sujetos presentaron alta proporción de LA y muy baja proporción de ALA.

Se sugiere que el principal mecanismo mediante el cual el LA contribuye a la patogénesis de la alergia es: 1) aumentando la producción de ácido AA, lo que desencadena su acumulación en los depósitos celulares, y 2) la transformación del AA endógeno en eicosanoides pro-alergénicos, como la PGE2 y el LTC4, los cuales participan en la inducción del cambio de isotipo a IgE y en la diferenciación de células efectoras como eosinófilos y mastocitos [22]. Si bien, en el presente estudio, no se cuantificaron los niveles de PGE2 y LTC4 de los pacientes, los resultados del test de sensibilización alérgica Phadiatop® y el conteo de eosinófilos en sangre periférica de los individuos sensibilizados, son consistentes con los mecanismos antes mencionados, pues los individuos sensibilizados mostraron cifras superiores de eosinófilos en sangre periférica, aunque sin mostrar eosinofilia en ningún caso.

Por su parte, la proporción de AA/EPA, es un parámetro que da indicio del tipo de eicosanoides predominantes que son producidos durante las respuestas inflamatorias [18]. En este caso, el parámetro indica que el principal sustrato disponible para la síntesis de mediadores lipídicos en ambos grupos, es el AA [23].

El índice de omega 3, que indica la proporción de los ácidos grasos n-3 con mayor relevancia biológica (EPA y DHA) con respecto a los ácidos grasos totales, resultó ser inferior a lo considerado saludable (11.5%) [24], para ambos grupos. Por lo tanto, la población completa presenta una deficiencia en ácidos grasos n-3.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio, a nivel nacional, en el cual se comparan los niveles de ácidos grasos n-6 y n-3 de individuos sensibilizados y no sensibilizados.

No se encontraron diferencias entre el perfil de ácidos grasos de individuos sensibilizados y no sensibilizados, presentando ambos grupos un serio desequilibrio entre los ácidos grasos n-6 y n-3. No obstante, la proporción de LA/ALA en los eritrocitos de los individuos sensibilizados es superior a la de los no sensibilizados, indicando la importancia de estos ácidos grasos durante el desarrollo de enfermedades alérgicas.

Este último hallazgo concuerda con lo propuesto de la hipótesis de los ácidos grasos de Black y Sharpe, la cual postula que, el incremento en la proporción de tisular de LA, puede incrementar el riesgo de desarrollar alergia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health "Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids", *Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 2012, p. 16, 2012.

[2]. White PJ, Marette A. "Potential role of omega-3-derived resolution mediators in metabolic inflammation", *Immunology and Cell Biology*, vol. 92, p. 7, 2012

[3]. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. "Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids", *Nutrition Reviews*, vol 68, no. 5, p. 10, 2010.

[4]. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. "Hipersensibilidad Inmediata. Inmunología Celular y Molecular". 6 ed. España*: ELSEVIER SAUNDERS*, pp. 441-61, 2008.

[5]. Murphy K, Travers P, Walport M. "Alergia e Hipersensibilidad. In: Fraga JdL", editor. Inmunobiología de Janeway. 7 ed. china: *McGraw-Hill Interamericana Editores SA de CV*, pp. 555-91, 2009.

[6]. van den Elsen LWJ, Nusse Y, Balvers M, Redegeld FA, Knol EF, Garssen J, et al. "n-3 Long-chain PUFA reduce allergy-related mediator release by human mast cells in vitro via inhibition of reactive oxygen species". *Brit J of Nut*, vol. 109, pp. 1821–31, 2013.

[7]. Lötvall J, Pawankar R, Wallace DV, Akdis CA, Rosenwasser LJ, Weber RW, "We call for iCAALL: International Collaboration in Asthma, Allergy and Immunology", *J Allergy Clin Immunol*. Vol.129, no. 4, pp.904-5, 2012.

[8]. Pawankar R; Canonica GW; Holgate ST; Lockey RF. "Libro blanco sobre alergias de la WAO". *WAO*, 2011 [Online]. Disponible en: http://www.worldallergy.org,

[9]. Hoff, S., Seiler, H., Heinrich, J., Kompauer, I., Nieters, A., Becker, A., Nagel, G., Gedrich, K., Karg, G., Wolfram, G., Linseisen, J. "Allergic sensitisation and Allergic rinitis are associated with n-3 poluunsaturated fatty acids in the diet and in red blood cell membranes", *Europ J of Clin Nut*, vol. 59, pp. 1071-1080.

[10]. Linneberg A. "The increase in allergy and extended challenges", *Allergy*, vol. 66, no. 95, p. 3, 2011.

[11]. Black PN, Sharpe S. "Dietary fat and asthma: is there a connection?", *European Respiratory Journal*, vol. 10, no. 1, pp. 6-12, 1997.

[12]. Shek LP, Chong MF-F, Lim JY, Soh S-E, Chong Y-S. "Role of Dietary Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Infant Allergies and Respiratory Diseases", *Clin and Develop Immunol*, vol. 2012, pp.1-8, 2012.

[13]. D'Vaz N, Meldrum SJ, Dunstan JA, Lee-Pullen TF, Metcalfe J, Holt BJ, et al. "Fish oil supplementation in early infancy modulates developing infant immune responses", *Clinical & Experimental Allergy,*vol. 2012, pp. 42:11, 2012.

[14]. Basiouni, S., Stockel, K., Fuhrmann, H., Schumann, J. "Polyunsaturated fatty acid supplements modulate mast cell membrane microdomain composition", *Cell Immunol,* vol. 275, no.1-2, pp. 42-46, 2012.

[15]. Potalla, J. V., Espeland, M. A., Polreis, J., Robinson, J., Harris, W. S. 2012. "Correcting the effects of -20 °C storage and aliquot size on erithrocyte fatty acid cotent in the Women's health Initiative", *Lipids*, vol. 47, pp. 835-846, 2012.

[16]. Petrovic, M., Kezic, N., Bolanca, V. 2010. "Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples", *Food Chemestry*, vol.112, pp. 285-291.

[17]. Black PN, Sharpe S. "Dietary fat and asthma: is there a connection?", European Respiratory Journal, vol. 10, no. 1, pp. 6-12, 1997.

[18]. Sears B, Ricordi, C. Anti-inflammatory nutrition as a pharmacological approach to treat obesity. J Obses. 1-14, 2011.

[19]. Bosma-den Boer MM, Wetten ML, Pruimboom L. Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. Nut & Met. 9:32, 2012.

[20]. Mimal Ratnayake WM, Galli C. Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper. Ann Nutr Metab. 55: 8-43. 2009.

[21]. Chilton FH, Murphy RC, Wilson BA, Sergeant S, Ainsworth H, Seeds MC, et al. Diet-Gene Interactions and PUFA Metabolism: A Potential Contributor to Health Disparities and Human Diseases. Nutrients. 6,1993-2022, 2014.

[22]. Shek LP, Chong MF-F, Lim JY, Soh S-E, Chong Y-S. "Role of Dietary Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Infant Allergies and Respiratory Diseases", Clin and Develop Immunol, vol. 2012, pp.1-8, 2012.

[23]. Arceo Giorgana L. Evia Arceo MA, Jiménez Soto A. Inflamación silenciosa. Recomendaciones para reconocer el estado de salud óptima en pacientes quirúrgicos. Cir. Plast. 17(3): 155-160. 2007.

[24]. Von Schacky C. The Omega-3 Index as a risk factor for cardiovascular diseases. Prostaglandins & other Lipid Mediators. 96:94-98. 2011.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LACTOFERRINA PARCIAL [*Homo sapiens*] (HUMANO) ACTUANDO COMO MECANISMO DE LA DEFENSA CONTRA BACTERIAS Y HONGOS.

Romero-Perez, L.G. y *Brena-Becerril, A.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 N°595 carretera Tlajomulco-Santa Fé, Lomas de Tejeda, Tlajomulco Jalisco.

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de 80 KDa producida por las células piteliales de las mucosas de los mamíferos, una de las funciones primordiales del (Lf) es el transporte de metales, también actúa como la proteína de la defensa ninguna específica y tiene la Capacidad de unirse al hierro. La (Lf) presenta una alta homología entre especies localizándose en secreciones mucosas como lágrimas, saliva, fluidos seminales y vaginales. En la leche y en particular en el calostro donde se encuentran las lactoferrinas, las (Lf) desplegadas en un amplio espectro antimicrobiano, actuando contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y contra algunos virus y hongos. En este trabajo, se busca encontrar relaciones de la Lactoferrina que se encuentra en los mamíferos y los primates, para el desarrollo y el aislamiento de diversas proteínas en fármacos. La busqueda de holmologos se realizó con algoritmos BLATSP, PSI-BLAST y DELTA-BLAST que se ejecutaron utilizando la secuencia caracterizada (Lf) homo sapiens para encontrar homologías en especies diferentes, con el fin de relacionar un árbol de diferentes proteínas y generar relaciones filiales que nos conduzcan con proteína de función similar. Las homologías que se presentan son filoproteicas de un análisis de 52 secuencias diferentes y que se reunieron por la base de datos del NCBI, los árboles y los alineamientos múltiples fueron construidos por estos programas clustalx, bioEdit, Mega6.

Palabras clave: lactoferrina; mecanismo de defensa antibacteriana; antiviral.

REFERENCIAS

[1] L. Elrashdy M Redwan, «Screening the anti infectivity potentials of native N- and C-lobes derived from the camel lactoferrin against hepatitis C virus,» BioMed Central, vol. 4, nº 14: 219, pp. 1472-6882, 2014.

[2] H. Chilton, «Potential of lactoferrin to prevent antibiotic-induced Clostridium difficile infection,» journal of antimicrobial chemotherapy, vol. 4.0, nº 71, pp. 975-985, 2016.

[3] A. Kerry J. Welsh, «Influence of Oral Lactoferrin on Mycobacterium tuberculosis induced immunopathology,» NIH Public Access, vol. 10.101, nº 91S1, pp. S105-S113, 2011.

HOMOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS EN ROEDORES.

Velázquez-Cortés, S.A. y *Brena-Becerril, A.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 N°595 carretera Tlajomulco-Santa Fé, Lomas de Tejeda, Tlajomulco Jalisco

*Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

La FABP7 es una proteína citoplasmática pequeña y altamente conservada que se une a ácidos grasos de cadena larga y otros ligandos hidrófobos [1]. Esta proteína es importante en el establecimiento de la fibra glial radial en el cerebro en desarrollo. El empalme alternativo y el uso del promotor dan como resultado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas [2]. Los pseudogenes de este gen se encuentran en múltiples cromosomas. La expresión de los mRNA de FABP7, es predominante en las etapas prenatal y perinatal en el cerebro de ratas y ratón. Esta proteína se expresa primero en los precursores de las células neuro epiteliales del cerebro en desarrollo y después se localiza, de una manera restringida, en células gliales y en astrocitos inmaduros [3]. La expresión en las células gliales persiste, únicamente, en la fibra del nervio olfatorio. También se expresa en la retina fetal humana y en los gliomas malignos. El mRNA de FABP7, está presente de una forma muy abundante en la glial radial, células progenitoras neurales, en la zona ventricular y en la zona subventricular, donde la neurogénesis es prominente.

Palabras clave: Glial radical; ácido oleico; astrocitos; neurogénesis.

REFERENCIAS

[1] Ángel A, A, Martín., (2012) Papel de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABPs), en la cadena de señalización del efecto neurotrópico del ácido oleico en neuronas, Universidad de Salamanca 40.

[2] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). "Basic Local Alignment 11 Search Tool", J. Mol. Biol.(215), 403-410.

[3] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). "The ClustalX 17 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis 18 tools", Nucleic Acids Research(25), 4876-4882.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PRODUCIDA POR LA MICROBIOTA INTESTINAL AISLADA DEL ESCARABAJO *Ulomoides dermestoides* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GÉNEROS BACTERIANOS.

[2]Ramírez-Anguiano, A.C., [1*]Ramírez-Medina, J., [2]Salazar-Camarillo, V.M., [2]Velázquez-Juárez, G.

1. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI), Departamento de Farmacobiología, C.P. 44430
2. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI), Departamento de Química, C.P. 44430.

*Autor para correspondencia: jonatan_lqfb@hotmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

Ulomoides dermestoides es un insecto originario de Asia el cual se ha distribuido mundialmente gracias a la cultura popular como recurso nutracéutico. Se ha demostrado la actividad citotóxica y genotóxica de compuestos volátiles de defensa sobre una línea celular de cáncer de pulmón humano. De igual forma se han demostrado otras propiedades con potencial terapéutico dentro de las cuales destaca la actividad antioxidante de los diferentes extractos dando como resultado una mayor actividad que un antioxidante de referencia. Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (EROS) son agentes oxidantes producidos en el organismo como parte del metabolismo normal y cuyo desequilibrio es responsable de ocasionar gran cantidad de enfermedades. El objetivo del presente estudio es proporcionar evidencia de que dicha actividad antioxidante se encuentra en aislados de la microbiota del insecto *U. dermestoides.* Se realizaron ensayos cualitativos con el reactivo (DPPH•) y posteriormente se cuantificó la actividad empleando el método de Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC). Se obtuvieron resultados favorables en la prueba cualitativa, por lo cual en la cuantificación los resultados fueron semejantes presentando algunas variaciones entre las colonias seleccionadas, esto confirma la presencia de actividad antioxidante producida por la microbiota intestinal de *U. dermestoides.*

Palabras clave: *Ulomoides dermestoides;* antioxidante; radicales libres; microbiota.

INTRODUCCIÓN

Ulomoides dermestoides es un insecto, de origen Asiático, que pertenece al órden coleoptera y a la familia Tenebrionidae. Fue descubierto por Chevrolat en 1878 y desde entonces se ha distribuido mundialmente debido a su amplio uso en la medicina tradicional a través de una práctica conocida como coleopteroterapia que consiste en la ingesta de escarabajos vivos [1].Esta terapia coadyuvante tiene la intención de auxiliar en el tratamiento de diversos padecimientos entre los que se encuentran el asma bronquial, dermatitis, artritis reumatoide, inflamación y diferentes tipos de cáncer [2]. Sin embargo hasta hace poco no existían suficientes bases científicas que justificaran su eficacia en las enfermedades mencionadas.

Crespo et al. (2010) encontraron que algunos compuestos de defensa de este escarabajo, principalmente benzoquinonas, tienen un efecto genotóxico y citotóxico contra una línea celular de cáncer pulmonar [3]. Del mismo modo también se ha demostrado que los extractos metanólicos de *U. dermestoides* contienen algunos compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria [4].

Dicha actividad derivada de compuestos antioxidantes podría sentar evidencia a las supuestas propiedades terapéuticas atribuidas a este insecto, ya que estas sustancias tienen la capacidad de inhibir los efectos deletéreos de los radicales libres producidos durante el metabolismo normal del organismo, al igual que de otras Especies Reactivas de Oxígeno (EROS) cuya producción desequilibrada se ha relacionado con diversas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, envejecimiento entre otras, de ahí la importancia de estudiar los sistemas antioxidantes de este insecto que pudieran ser aprovechados para el desarrollo de terapias novedosas para mejorar la salud humana [5].

El objetivo del presente estudio fue proporcionar evidencia de que dicha actividad antioxidante proviene de la microbiota intestinal de *U. dermestoides* y de sus metabolitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Disección de escarabajos

Se seleccionaron 10 escarabajos adultos identificados de la especie *Ulomoides dermestoides* los cuales fueron criados bajo condiciones experimentales en el Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Para auxiliar en la disección se utilizó un microscopio digital y pinzas de disección para insectos. Se siguió un protocolo similar reportado anteriormente [6] para la disección de *Tenebrio molitor,* insecto perteneciente a la misma familia.

Las superficies de los insectos se esterilizaron por inmersión en etanol (75% v/v) durante 1 min y posteriormente se lavaron 2 veces con solución salina fisiológica estéril (0.9 % NaCl).
Después se extrajo el intestino de cada insecto, se colocaron en un tubo cónico con 10 mL de solución salina fisiológica estéril, y se agitaron en vórtex por 5 min. Subsecuentemente se prepararon 3 diluciones decimales seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000).

Siembra en medios de cultivo.

Se tomó una alícuota de 100 µL de cada dilución decimal, y se sembró utilizando la técnica de extensión en superficie en los siguientes medios de cultivo:
-Agar LB (Luria Bertani): medio nutritivo.
-Agar MacConkey: medio utilizado para el aislamiento de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos.
-Agar Bilis Rojo Violeta: medio utilizado para el aislamiento de microorganismos coliformes.
-Agar Sabouraud: medio utilizado para el aislamiento de mohos y levaduras.

Los medios se incubaron a 35±2°C durante 24 h, excepto para el agar Sabouraud que se incubó durante 48 h.

Selección y resiembra de colonias diferenciadas.

Posterior al periodo de incubación se procedió a seleccionar Unidades Formadoras de Colonias (UFC) aisladas basándose en su morfología y características presentadas en los medios, obteniéndose un total de 7 colonias, identificadas alfabéticamente (A-G). Cada una de las UFC´s seleccionadas se resembró en agar LB (35±2°C/24h) para obtener un cultivo puro de las mismas. Las placas obtenidas se conservaron en refrigeración a 4°C hasta posterior uso y se realizó un stock de glicerol (25%) de cada UFC que se conservaron a -20°C.

No se seleccionaron UFC´s del medio Sabouraud por la imposobilidad de cultivo posterior en un medio que no interfiriera con la medición de actividad antioxidante, sin embargo sí se obtuvo crecimiento en el mismo.

Determinación cualitativa de actividad antioxidante con DPPH.
Para evaluar cualitativamente la capacidad antioxidante de las UFC´s seleccionadas se procedió siguiendo un protocolo similar reportado por Sheryanne et al. (2015).[7] De cada cultivo puro se puncionó superficialmente el centro de una colonia aislada utilizando una asa de nicromo recta y se extendió sobre un fragmento de papel filtro Whatman No.1, colocando éste sobre una caja de petri de vidrio. Posteriormente se preparó una solución del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de color violeta oscuro (100 µg/ mL de etanol), se roció sobre cada papel filtro inoculado y se almacenaron en obscuridad durante 30 min para observar la pérdida de color.

Siembra de colonias seleccionadas en medio mínimo M9.

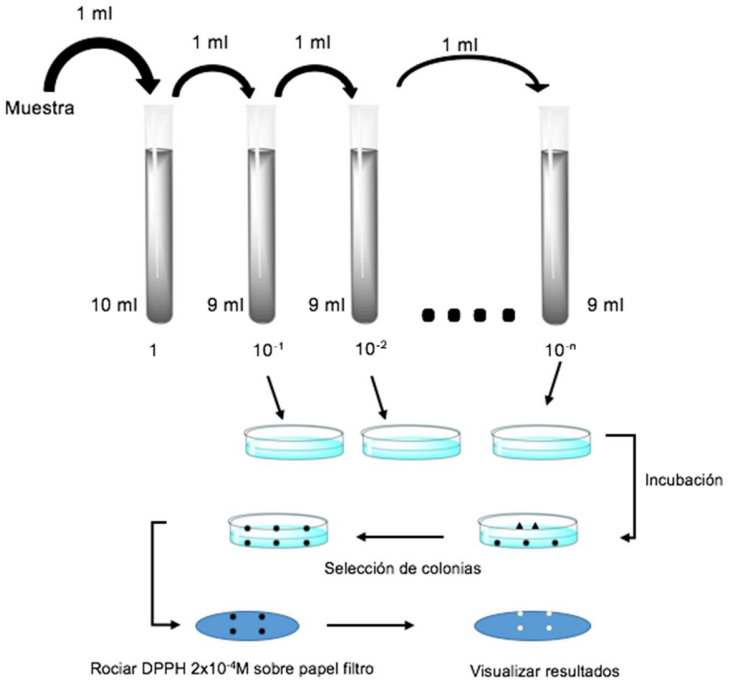


Fig. 1 Método cualitativo para la detección de actividad antioxidante en colonias microbianas basado en la decoloración del radical DPPH●. n = número de dilución decimal.

Con el objetivo de evitar interferencias para la cuantificación de la actividad antioxidante se evaluó la factibilidad de utilizar el medio M9. Para ello se realizó un ensayo utilizando medio no inoculado. Se encontró que éste no tenía actividad antioxidante *per se.* Por lo tanto se procedió a la siembra de las colonias seleccionadas en medio M9 de composición: 33.7 mM Na_2HPO_4, 22.0 mM KH_2PO_4, 8.55 mM NaCl, 9.35 mM NH_4Cl, 0.3 mM $CaCl_2$, 1mM MgSO4 y 0.4% de glucosa como fuente de carbono.

Las colonias seleccionadas, más una cepa de *Escherichia coli* que sería utilizada como control para los ensayos de actividad antioxidante, se reactivaron sembrándolas en tubo cónico con 10 mL de caldo LB (10 g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl) incubando a 35±2°C durante 24h. Posteriormente se hicieron 2 lavados de cada medio con crecimiento, centrifugando a 4500 rpm durante 15 min, decantando el sobrenadante y resuspendiendo con 10 mL de solución salina fisiológica estéril en cada lavado. Se resuspendió utilizando vórtex. Se inocularon 100 µL de cada lavado en 10 mL de medio M9 y se incubó a 35±2°C durante 24 h.

Determinación cuantitativa de actividad antioxidante.
Cada uno de los tubos con crecimiento microbiano en medio M9 se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min, se pasó el sabrenadante a otro tubo estéril y se refrigeró (4 °C) hasta su posterior uso.
Se preparó una curva de calibración para ensayo TEAC pesando 2 mg de Trolox (Sigma Aldrich) disolviendo en 5 ml de etanol más 5 ml de agua, obteniendo una concentración 800µM A partir de ésta se hicieron diluciones para la curva de calibración con concentraciones de 0-400 µM.

La producción del radical se realizó por reacción de volúmenes iguales de ABTS (Sigma Aldrich) 7mM con Persulfato de amonio 2,45 mM (Sigma Aldrich), seguido de incubación en oscuridad por 16 h. Se mezclaron 280 µL del radical ABTS• ajustado a una Ab_{405}=1.0 con 20 µL de las diluciones de Trolox y se midió la absorbancia de la reacción a 405 nm utilizando lector de microplacas (Multiskan® Ex, Thermo Fisher Scientific) cada 5 min, hasta completar 30 min, momento en el cual la reacción se estabiliza. Se midió un patrón bajo condiciones similares utilizando agua en lugar de muestra.

Las pruebas para las colonias seleccionadas se realizaron de manera similar. Se tomaron 10µL del sobrenadante, se diluyó con 10 µL de agua destilada y se mezcló con 280 µL del radical ABTS. Las lecturas se hicieron a los mismos intervalos de tiempo.

Para determinar el porcentaje de Captación de radicales expresado como %CR se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%CR = \frac{[(Ap - Abp) - (Am - Abm)}{(Ap - Abp)} x100$$

Donde:
Ap = Absorbancia del patrón
Abp = Absorbancia del blanco patrón
Am= Absorbancia de la muestra
Abm = absorbancia del blanco de muestra

Extracción de DNA genómico para estudios moleculares.

Para la extracción de DNA genómico se utilizó el reactivo DNAzol ® siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor. Se cuantificó el DNA utilizando espectrofotómetro NanoDrop ™ (Thermo Scientific ™).

Análisis de datos

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism 7 para macOS (GrapPad Software).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación cualitativa de actividad antioxidante con DPPH.

Los resultados obtenidos (Fig. 2) muestran una decoloración variable del papel filtro en los sitios donde se realizó el inóculo, resaltando éstos sobre un fondo violeta sin cambio de color evidente.

Estos resultados proporcionan una evidencia visual de la actividad antioxidante evaluada sobre cada colonia aislada.

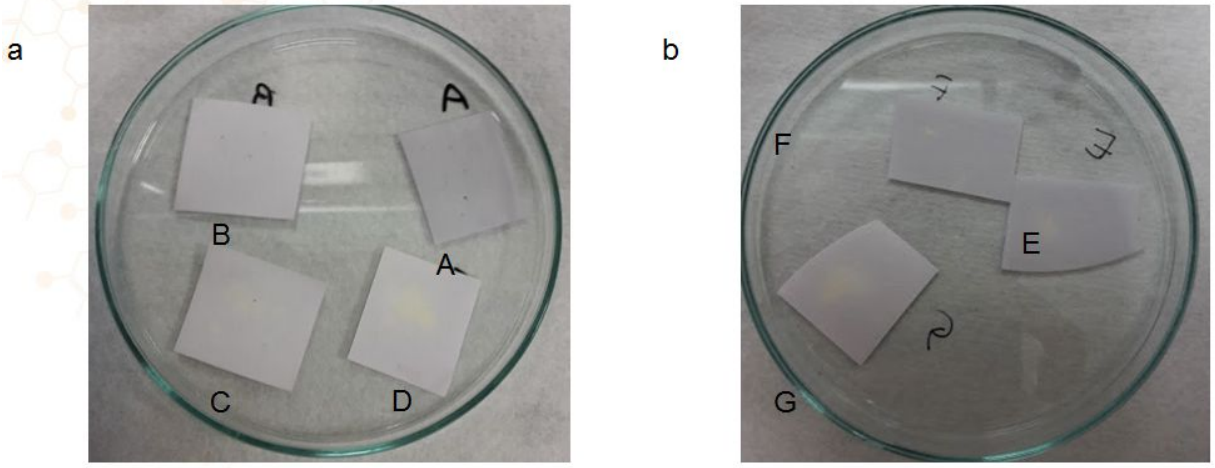


Fig. 2 Resultados de prueba cualitativa de actividad antioxidante utilizando el reactivo DPPH sobre las colonias (a) A,B, C y D y (b) E, F y G inoculadas en papel filtro. Se observa la decoloración variable en los sitios del inóculo contra un fondo violeta.

La positividad en esta prueba cualitativa para la detección de potencial actividad antioxidante en todas las colonias seleccionadas propició la cuantificación de la misma por el método TEAC.

Además con estos resultados se proporciona un método simple para el cribado de la actividad antioxidante en cepas microbianas de diversos orígenes.

Ensayo TEAC y porcentaje de captación del radical ABTS• (%CR)

La curva de calibración para el ensayo TEAC muestra una linealidad adecuada (R^2=0.9963) para la interpolación de concentraciones. En la gráfica (fig 3, inciso B) se observa que todas las cepas seleccionadas tienen una concentración equivalente a Trolox por encima del control. Las cepas A, D y F presentan los mejores resultados.

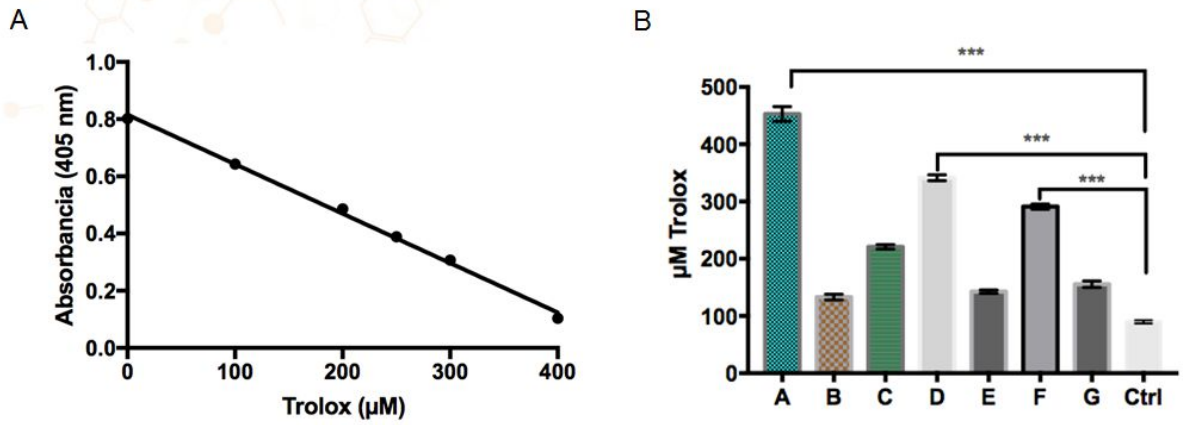


*Fig. 3 A) Curva de calibración para ensayo TEAC. R^2=0.9968. B) Resultados de TEAC para las cepas (A-G) y la bacteria control E. coli después de 30 min de reacción. "Ctrl"= E. coli. ***p<.001*

Los resultados de la Capacidad de Captación del Radical ABTS (%CR) muestran un patrón similar, con las cepas A, D y F presentando la mejor actividad antioxidante.

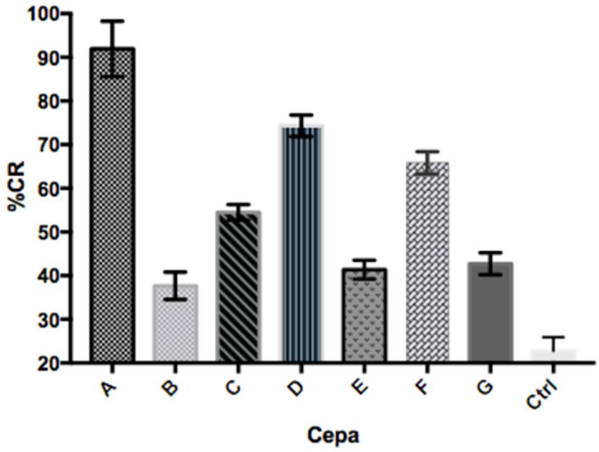


Fig. 4 Gráfico de la Capacidad de Captación del Radical ABTS (%CR) después de 30 min de reacción. Ctrl = E. coli.

Los resultados obtenidos evidencían la presencia de actividad antioxidante en cepas aisladas de la microbiota intestinal de *U. dermestoides* comparadas con una bacteria de la microbiota intestinal del ser humano. Esto pone de manifiesto la existencia de poblaciones microbianas con capacidades antioxidantes mesurables, que se diferencían entre sí de forma notable. Se ha reportado anteriormente la presencia de actividad antioxidante en extractos metanólicos de cuerpo entero del escarabajo *U. dermestoides* [4] sin embargo no se había rastreado el origen de dicha acitvidad con certeza. Nuestro estudio sugiere que un candidato podría ser la microbiota propia del insecto y sus metabolitos, ya que a pesar de ser relativamente pocas las colonias aisladas se logró evidenciar su potencial antioxidante.

La identificación de las mismas conforma la siguiente etapa de la investigación que se pretende realizar por amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio evidencían la presencia de actividad antioxidante en aislados de la microbiota intestinal de *Ulomoides dermestoides* bajo los procedimientos seguidos. Sin embargo son necesarios más estudios para lograr una completa caracterización de este sistema presente en el escarabajo lo cual permitiría el posible desarrollo de terapias que beneficien la salud humana y justificaría mayormente su actual uso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Cupul, F. "Sobre el uso de Ulomoides dermestoides (Chevrolat, 1878), (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperini) en la coleopteroterapia: informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México. *Asoc. Esp. Entomol*, vol. 34, pp. 419-422, Nov. 2010.

[2] Nur Alam, Nusrat Jahan Bristi, Rafiquzzaman. ¨Review on and methods evaluation of antioxidant activity¨ *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 21, pp.143-152, ISSN 1319-0164, Abr. 2013.

[3] Crespo R, Villaverde ML, Girotti JR, Güerci A, Juárez MP, Bravo MG. ¨Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of Ulomoides dermestoides on A549 cells¨. *J Ethnopharmacology*, vol. 136, pp.204-209, Jun. 2011.

[4] D. Mendoza Meza, M. Salgado Yepes, L. Durant Ibarra, "Capacidad antioxidante de extractos metanólicos de cuerpo entero del escarabajo Ulomoides dermestoides (Chevrolat, 1893)," *Rev. Cuba. Investig. Biomed.*, vol. 32, no. 4, pp. 402–410, 2013.

[5] D. L. Mendoza Meza and C. Maury Fals, "Evaluación del contenido de fenoles totales y actividad captadora de radicales libres de extractos hidrometanólicos del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (coleoptera: tenebrionidae)". *Rev. Asoc. Col. Cienc.*, vol. 25, pp. 135–141, Sep. 2013.

[6] Y. Yang *et al.*, "Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, no. 20, pp. 12087–12093, 2015.

[7] Velho-Pereira S, Parvatkar P, Furtado IJ. Evaluation of Antioxidant Producing Potential of Halophilic Bacterial Bionts from Marine Invertebrates. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.77, pp.183-189, Abr. 2015.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía
"Ciencia e Innovación para la Salud".
Universidad Autónoma de Guadalajara

SÍNTESIS *IN VITRO* DE MICROCISTINAS POR *Microcystis aeruginosa* AISLADA DE LA LAGUNA DE CAJITITLÁN. (*IN VITRO* MICROCYSTINS SYNTHESIS, FOR *Microcystis aeruginosa* ISOLATED FROM LAKE CAJITITLÁN).

Villalobos-Ornelas, P.C., *Vizcaíno-Rodríguez, L.A., Luján-Godínez, R., y Caro-Becerra, J.L.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Km 3.5 N°595 carretera Tlajomulco-Santa Fe, Lomas de Tejeda, Tlajomulco Jalisco.

*Autor para correspondencia: adyvizcaino7@gmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

En cuerpos de agua eutrofizados, es común encontrar microorganismos que se dispersan finamente en la columna de agua causando turbidez, dentro de ellos *Microcystis aureginosa,* miembro de la familia *Microcystaceae*, forma agregados celulares que cubren grandes extensiones "florecimientos algales", inicialmente de forma esférica y conforme transcurre el tiempo sin forma definida; son cianobacterias Gram negativas fotosintéticas. Su abundancia relativa, es de gran importancia, debido a su capacidad de producir endotoxinas "microcistinas", con efecto en la salud de animales y personas que están en contacto directo con el alga o el agua. La laguna de Cajititlán, actualmente enfrenta severos problemas de contaminación, por ello, se monitorea el fitoplancton para determinar la diversidad y abundancias de especies. El presente trabajo es el primer estudio de toxicidad realizado a cepas de *Microcystis aureginosa* aisladas a partir de la laguna y cultivadas *in vitro*, mismo que permitió demostrar que el microorganismo contienen la información genética que codifica para la síntesis de microcistinas y a partir de 8 días de cultivo *in vitro*, los extractos de proteína intracelulares inhiben la actividad catalítica de la fosfatasa alcalina; cabe mencionar que la exposición continua a microcistinas induce deformación de hepatocitos y a altas dosis carcinoma hepatocelular.

Palabras clave: Fosfatasa alcalina; fitoplancton; cianobacterias; actividad enzimática.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son células primitivas con un sistema bioquímico muy sofisticado, presentan rasgos de bacterias y algas; su coloración es verde o verde – azulado, debido a la presencia intracelular de clorofila a y ficobiliproteinas (Ficoeritina-C, Ficocianina-C y Aloficocianina-C) [1]. Las cianobacterias son formadoras de floraciones o *Bloom* en aguas continentales eutrofizadas (con altos niveles de nitrógeno y fósforo), la intensidad luminosa, la temperatura y otros residuos químicos (producto de la contaminación) promueven la multiplicación celular, en lapsos de horas o días, una de las respuestas inmediatas y evidentes es la disminución de la diversidad de las comunidades, ello favorece el incremento de un reducido número de especies aptas para crecer en estas condiciones especiales y con ello se altera la composición de la biota que alberga el cuerpo de agua, motivo por el cual se consideran indicadores del deterioro de la calidad ambiental [2].

Una de las especies de cianobacterias que predomina en estos ambientes es *Microcystis*, la cual, al igual que otras cianobacterias, llega a florecer en aguas turbias, con altas *temperaturas* y poco movimiento de agua, sus florecimientos pueden pasar desapercibidos debido a que se acumula al fondo de la columna de agua [3]. Sus células carentes del núcleo celular producen oxigeno mediante fotosíntesis, se multiplican formando colonias en una vaina mucilaginosa. Su presencia en cuerpos de agua debe ser monitoreada, debido a que tiene la capacidad de sintetizar y acumular toxinas de forma intracelular: *microcistinas,* ciclopéptidos de bajo peso molecular. Los genes que codifican para las péptido sintetasas son modulares y codifican solo para una unidad, están presentes solo en cepas tóxicas. Las microcistinas son hidrofílicas y requieren transporte activo (con gasto de ATP) para atravesar las membranas celulares, por ello su toxicidad se restringe a células que expresan una molécula de transporte aniónico en sus membranas: células hepáticas [4].

Su efecto tóxico se debe a la unión covalente del péptido y la subunidad catalítica al residuo de cisteína-273 y cisteína-266 de las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A, respectivamente; lo cual conduce a la hiperfosforilación de las proteínas celulares, que origina deformación celular e induce el desarrollo de cáncer [5].

Estudios recientes de biodiversidad realizados en la Laguna de Cajititlán, demostraron la presencia recurrente de cianobacterias, principalmente en primavera e invierno, se detectó *Microcystis aureginosa, Pseudanabena, Espirulina*, *Planktothrix*, *Aphanizomenom, Cylindrospermopsis raciborskii, Oscillatoria sp. y Anabaena.* Con la finalidad de determinar la capacidad tóxica de dichos microorganismos se procedió al aislamiento de cepas, a partir de muestreos mensuales realizados durante 2015 y 2016 [6].

El presente estudio tiene por objetivo demostrar la capacidad de producción de toxinas intracelulares de una cepa de cianobacterias identificada morfológicamente como *Microcystis Aureginosa* recuperada a partir de la Laguna Cajititlán, ya que las condiciones actuales de eutrofización favorecen el desarrollo de floraciones algales y ello es considerado una causa principal de la muerte recurrente de peces, y un problema potencial de salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica Microbiana de la Universidad Politécnica de Guadalajara, durante los meses de enero a agosto de 2017. Se empleó una cepa de *Microcysitis aeroguinosa* proporcionada por el laboratorio, purificada a partir del lago de Cajititlán, Kit de Medición de fosfatos Hach phosVer 3; kit para determinación de Sulfatos Hach SulfaVer 4; Kit de Medición de Nitritos Hach NitriVer 3, Kit de Medición de Nitratos Hach NitraVer 5; Kit de Medición de Dureza Hach Hardness reagent set, Kit Fosfatasa Alcalina Spinreact. Espectrofotómetro UV-Vis marca Perkin Elmer, Espectrofotómetro visible DR2800 marca HACH.

Métodos

Establecimiento de cultivo: se emplearon medios comerciales: Cyanobacteria BG-11Fresh Water Solutión (Sigma-Aldrich) y Bold Modified Basal Fresh Water Nutrient Solution BMBFW, marcha Sigma-Aldrich.

Cinética de crecimiento: Se realizó monitoreo por triplicado durante 10 días de cultivo. Variables: concentración (mg/L) de Sulfatos (SO4), fosfatos (PO4), Nitratos (NO3) y Nitritos (NO2). Se realizaron

curvas de calibración para cada uno de los aniones y empleando dilución 1:10 de las muestras se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante se registraron lecturas y se calculó la concentración. Empleando las longitudes de onda de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla1. Longitudes de onda empleadas en la determinación de aniones en muestras de agua de cultivo de *Microcystis aureginosa*.

Variables	Nitritos	Nitratos	Fosfatos	Sulfatos
Longitud de onda (nm)	500	585	430	450

Alcalinidad

Se emplearon 5 mL de medio de cultivo, se titularon con EDTA 0.004 molar, la concentración en (mg/L) se determinó empleando la siguiente ecuación [7]:

$$\frac{(\text{ml EDTA})(\text{Molaridad})(1000)}{\text{ML muestra (5 ml)}}$$

Actividad enzimática

Elaboración de extracto intracelular: Se emplearon 20 ml de Cultivo celular, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El cultivo se re suspendió en agua destilada y se sometió a un proceso de zonificación durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 2000 revoluciones. A partir del sobrenadante se tomaron 200 µl de solución y se hicieron reaccionar con 1.2 ml de enzima acondicionada de acuerdo con las instrucciones del fabricante (fosfatasa alcalina p-Nitrofenilfosfato. Cinético. DGKC, SPINREACT). La muestra se incubó durante 1 minuto a 37°C, posteriormente se determinó absorbancia, durante tres minutos empleando un espectrofotómetro UV-VIS y longitud de onda de 405 nm. Se determinó a los 9 y 17 días de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH se conservó en el rango de 7 a 7.9 durante los días de cultivo. Las concentraciones de nitrato disminuyeron desde el primer día de cultivo hasta registrar un valor mínimo de 4.6 mg/L a los 10 días de incubación. Por otro lado el valor más bajo de fosfato se registró el día 9 y correspondió a: 4.8 mg/L.

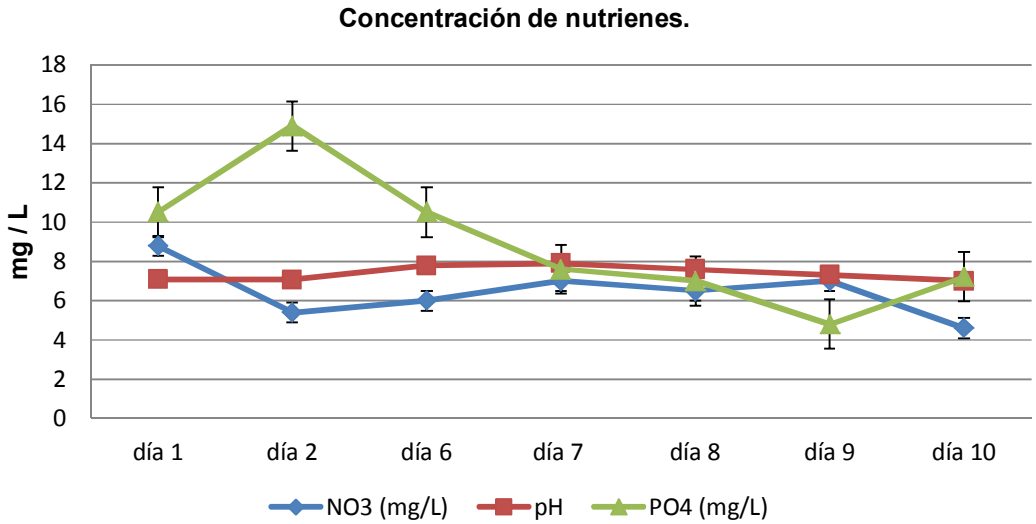


Figura1. Contenido de Nutrientes, nitrógeno, fosforo y potasio en el medio de cultivo monitoreado durante la cinética de crecimiento de *Microcystis aureginosa*.

La alcalinidad promedio fue de 0.67 con una desviación estándar de 0.12 mg/L ver Figura 2.

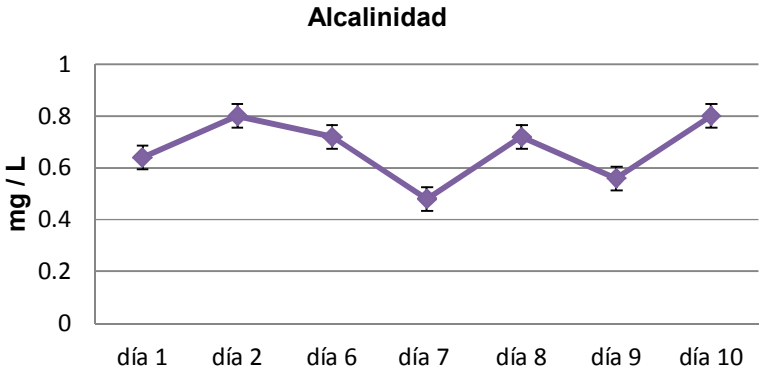


Figura 2. Alcalinidad detectada durante 12 días de cultivo *in vitro* de *Microcystis aureginosa* recuperada en la Laguna de Cajititlán.

En la figura 3 se observa la concentración de Sulfatos, el valor máximo fue de 80 mg/ L y el más bajo 65 mg/L al día 9 de cultivo.

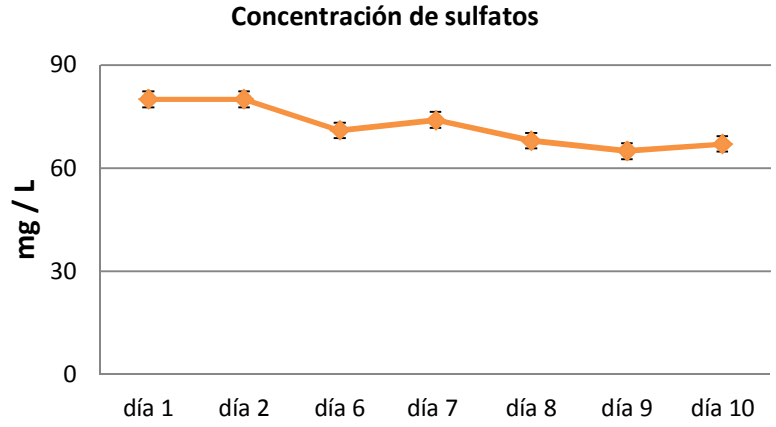


Figura 3. Concentración de Sulfatos durante 10 días del cultivo *in vitro* de *Microcystis aureginosa.*

Respecto al consumo de nutrientes nuestros resultados coinciden con los reportados por otros investigadores, ya que se observó un consumo preferente por Fosfato, Sulfato y Nitratos [8].

En la Figura 4 se observa la biomasa recuperada del cultivo expresada en gramos/ Litro, la tasa de crecimiento (μ) fue 1.29 días-1, el Tiempo de duplicación (TD) calculado fue 0.537 días, y las divisiones por día (D) se estimaron en 1.86. Estos resultados son menores a los reportados para cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* con tasa de crecimiento (μ) desde 0.054 día-1 hasta 0.285 días, TD de 2.434 días y D 0.41 divisiones por día [9].

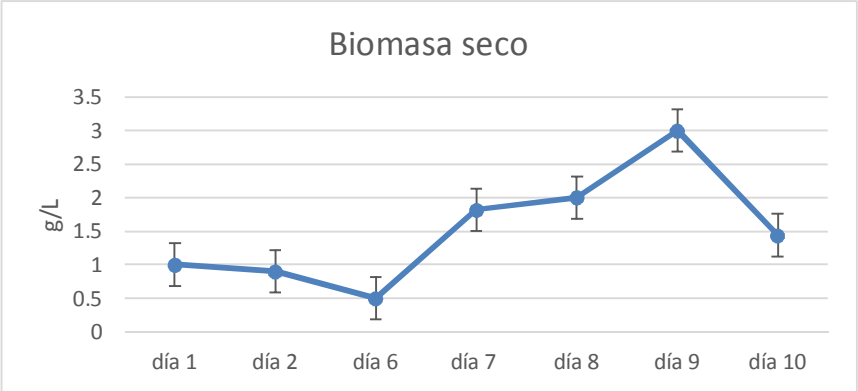


Figura 4. Biomasa seca recuperada a partir del cultivo de células de *Microcystis aureginosa in vitro*.

Actividad enzimática

La determinación de actividad enzimática se determinó a partir del día 8 de cultivo en la fase de desaceleración celular, se observó perdida de actividad enzimática con valor de -9,9 UI, el día 9 de la cinética se observó una disminución de 18.5 UI; el valor más bajo se observó al día 17 con una disminución de 365 UI de actividad enzimática, ver Figura 5.

Estos resultados permiten demostrar la capacidad tóxica de la cepa recuperada a partir de la Laguna de Cajititlán, debido a la presencia intracelular de microcistinas que inhiben la actividad de la fosfatasa alcalina [5].

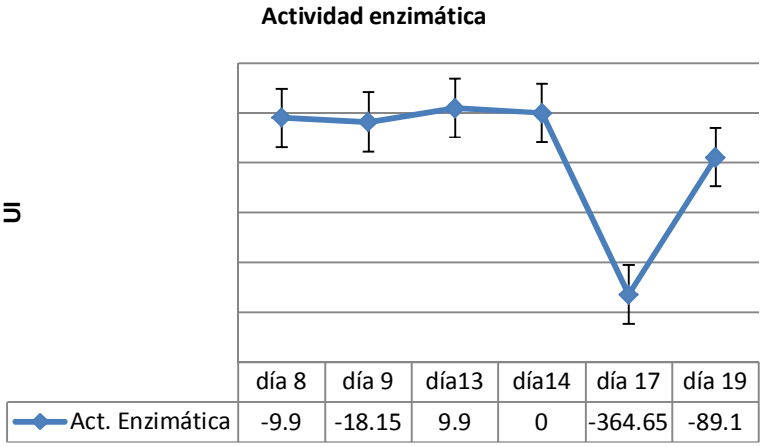
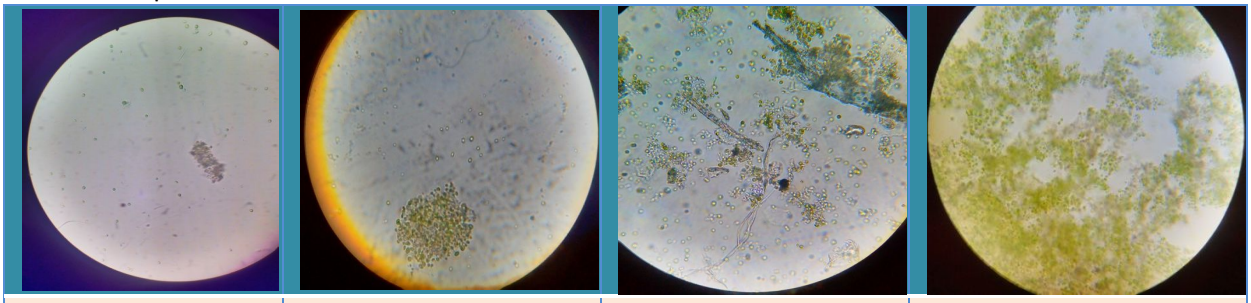


Figura 5. Disminución de actividad enzimática, característico de la presencia de microcistinas producidas por el cultivo de *Microcystis aureginosa* recuperada de la Laguna de Cajititlán.

Microscopia

La figura 6 muestra el crecimiento del cultivo al día 1, 6, 9 y 17 de incubación, como se puede observar al día 17 es posible observar la formación de un Bloom celular.



Día 1: Células individuales.	Día 6: Formación de colonias.	Día 9: Incremento en la cantidad de células tanto individuales como formando colonias.	Día 17: Florecimiento algal.

Figura 6. Obtención de un Bloom de *Microcystis aureginosa* recuperada del lago Cajititlán, después de 17 días de cultivo en condiciones controladas de laboratorio.

Los resultados obtenidos corresponden a los reportados por otros investigadores ya que la formación de toxinas intracelulares se observa cuando se alcanza una alta densidad celular y la presencia de colonias de forma irregular [10].

CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de microcistinas intracelulares en cepas de *Microcystis aureginosa* recuperadas del Lago Cajititlán.

REFERENCIAS

[1] Chorus I., Falconer I., Salas H.J., Bartram J. Riesgos a la salud causados por Cianobacterias y Algas de agua dulce en aguas residuales. https://es.scribd.com/document/75983326/Cianobacterias-riesgos-en-Salud#. Fecha de consulta 19 de agosto de 2017.

[2] L. De León, "Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. En: Perfil Ambiental del Uruguay 2002", Domínguez, A. y R. G. Prieto (eds.), Nordan-Comunidad, Montevideo, pp.28-37, 2002.

[3] D. Zhao, X. Cao, R. Huang, J. Zeng, & Q. L. Wu, " Variation of bacterial communities in water and sediments during the decomposition of Microcystis biomass", World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 28, no. 11, pp. 3159-3170, 2012.

[4] B. C. Hitzfeld, S. J. Hoger, and D. R. Dietrich, "Cyanobacterial Toxins: Removal during Drinking Water Treatment, and Human Risk Assessment". Environmental Health Perspectives, vol. 108, no. 1, pp. 113-122. March 2000.

[5] H. Fujiki, M. Suganum, "Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors" Prog Mol Subcell Biol, vol. 46, pp. 221-54, 2009.

[6] L.A. Vizcaíno, J.L. Caro, R. Luján, I. Sam, T. Baltazar, P. A. Mayoral, "Un método alternativo para detección de fitoplancton". XVI Congreso Internacional, XXII Congreso Nacional de ciencias ambientales, Universidad de Quintana Roo, junio 2017.

[7] Parámetros fisicoquímicos: Alcalinidad https://www.academia.edu/32189050/PARAMETROS_FISICO-QUIMICOS_ALCALINIDAD?auto=download fecha de consulta 20 de Septiembre de 2017.

[8] H. Utkilen* and N. Gjølme, "Iron-Stimulated Toxin Production in Microcystis aeruginosa", Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 2, pp. 798-800, febrero 1995.

[9] G. Mercado-M., N. Duarte-muñoz, E. Álvarez-Parrilla, L.A. De la Rosa, Wall-Medran, "Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1): Bioquímica y aplicaciones en las ciencias biomedicas, ecológicas y alimentarias", Tecnociencia Chihuahua, vol. 6, no.2, pp. 112-122, marzo 2012.

[10] S. Otaño, C. Bogarín, "Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria, Nostocales) productora de microcistinas en Corrientes, Argentina", 2014. Disponible en línea. http://www.scielo.org.ar/img/revistas/ata/v22n3/html/v22n3a06.htm. Fecha de consulta 10 de Septiembre de 2017.

RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL LA MICROCISTINA EN DIFERENTES ORGANISMOS PARA DETERMINAR SU PRESENCIA Y NIVEL DE TOXICIDAD.

Villalobos-Ornelas, P.C., *Vizcaíno-Rodríguez, L.A. y Brena-Becerril, A.

Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Ingeniería en Biotecnología. Km 3.5 N°595 carretera Tlajomulco-Santa Fé, Lomas de Tejeda, Tlajomulco Jalisco.

*Autor para correspondencia: adyvizcaino7@gmail.com

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

Las cianobacterias son bacterias fototróficas, que habitan diversos ambientes en todo el planeta. Estacionalmente, dominan muchos lagos eutróficos impactados por el exceso de nitrógeno (N) y fósforo (P) formando densas acumulaciones de biomasa conocidas como flores de algas nocivas de cianobacterias o cyanoHABs. Su dominio en los lagos eutróficos se atribuye a una variedad de adaptaciones únicas incluyendo mecanismos de concentración de N y P, fijación de N_2, formación de colonias que inhibe la depredación, movimiento vertical a través de vesículas de gas y producción de moléculas tóxicas o bioactivas. Mientras que algunas de estas moléculas han sido exploradas por sus beneficios medicinales, otras son potentes toxinas perjudiciales para los seres humanos, animales y otras especies silvestres conocidas como cianotoxinas [3]. Un ejemplo de cianotoxina es la Microcistina (MC), que presenta una estructura heptapeptídica, es producida por las floraciones de cianobacterias tóxicas de aguas superficiales eutróficas. El desarrollo de las flores de cianobacterias se ha convertido en un serio problema en todo el mundo debido a que muchas cianobacterias han producido una amplia variedad de compuestos bioactivos, uno de ellos son las cianotoxinas, en las que predomina las MCs, y se considera uno de los grupos más peligrosos debido a que su toxicidad potencial causa mortalidad y enfermedad en los animales y los seres humanos [1]. La proliferación mundial de la producción de toxinas de flores de cianobacterias ha ganado la atención internacional en los últimos años. Estos incrementos han sido atribuidos a una amplia variedad de factores ambientales, incluyendo la contaminación de nutrientes, aumento de la temperatura, la salinidad, el tiempo de residencia del agua, la estratificación vertical, y el pH, muchas de las cuales es probable que se exacerbados por el cambio climático [2].

Palabras clave: Cianobacterias; Bioinformática; Microcistinas; Toxinas.

REFERENCIAS

[1] M.-S. Kim, «Accumulation of Microcystin (LR, RR and YR) in Three Freshwater Bivalves in Microcystis aeruginosa Bloom Using Dual Isotope Tracer,» 17 Julio 2017. [En línea].

[2] H. MDA, «Microcystin Prevalence throughout Lentic Waterbodies in Coastal Southern California.,» 22 Julio 2017. [En línea].

[3] M. TR, «Cyanobacterial Toxins of the Laurentian Great Lakes, Their Toxicological Effects, and Numerical Limits in Drinking Water.,» 2 Junio 2017. [En línea].

EFECTO DE FTALATOS EN LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

Flores- Kelly, J.M., Balderas- Hernández, V.E. y De-León-Rodríguez A.

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a la Presa San José 2055. Col Lomas 4A Secc. San Luis Potosí, S.L.P. CP 78216.

*Autor para correspondencia: aleonr@ipicyt.edu.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

Los ftalatos son ésteres de ácido ftálico usados industrialmente como aditivos plásticos ya que les confieren a los materiales las propiedades físicas deseadas como flexibilidad y durabilidad. Sin embargo, los ftalatos no se unen químicamente al polímero y por lo tanto pueden liberarse al medio que los rodean [1]. Con ello el hombre se encuentra en constante exposición a estos compuestos, los ftalatos se han encontrado en el humano en sangre, orina, saliva, fluido amniótico, leche materna y cordón umbilical. Un ejemplo de dicha exposición son los dispositivos médicos para almacenar sangre de transfusión o sangre de cordón umbilical, los cuales liberan el plastificante mayoritario hacia las muestras contenidas. Debido a su estructura química, similar al de algunas hormonas, los ftalatos son clasificados como xenoestrogenos, es decir, químicos hechos por el hombre que tienen la capacidad de mimetizar el estrógeno. La citotoxicidad de los ftalatos se debe entonces a su interacción con receptores de estrógenos del tipo α (ERα) y del tipo β (ERβ), los receptores de andrógenos (AR) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) de tipo α, β y γ (PPARα, PPARβ y PPARγ, respectivamente). Por otra parte, los ftalatos pueden inhibir algunas enzimas capaces de metabolizar xenobióticos y de hacer que las células secreten una variedad de compuestos que alteran a la propia célula, como por ejemplo citocinas proinflamatorias. Además los ftalatos tienen efectos en la reproducción, daño al esperma, inicio temprano de la pubertad, anormalidades del tracto reproductivo, infertilidad y resultados adversos del embarazo, neurodesarrollo y alergias [2]. En este trabajo se realizaron ensayos de inocuidad para medir la viabilidad celular de las células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical expuestas a la presencia de dietil ftalato (DEP), dietilhexil ftalato (DEHP) y diisononil ftalato (DINP) y se analizó el efecto de estos compuestos sobre la expansión de los progenitores hematopoyéticos mediante ensayos clonogénicos. En los ensayos de inocuidad se observó que en los cultivos tratados con 10 y 100 µg/ml de DEHP y DINP presentaron una disminución significativa en la viabilidad celular respecto a los controles no expuestos al ftalato. No obstante, en los ensayos clonogénicos se observó que en los cultivos tratados con 100 µg/ml de DEHP y DINP presentaron una disminución significativa en la formación de colonias respecto a los controles. En cambio, los cultivos expuestos a DEP en ambos ensayos no presentaron diferencias significativas respecto a los controles. Por lo tanto, el DEP es menos tóxico que el DEHP y el DINP. Se agradece el apoyo parcial del Proyecto CONACyT Fondo Sectoral SALUD-2013-01-233340.

Palabras clave: plastificador, DEHP, DEP, DINP, disruptor endócrino, toxicidad, progenitores hematopoyéticos.

REFERENCIAS

[1] J. Autian, 1973. "Toxicity and Health Threats of Phthalate Esters: Review of the Literature." Environmental Health Perspectives, vol. 4, pp. 3–26, 1973.

[2] T. Krüger , Y. Cao, S.K. Kjærgaard, L.E. Knudsen and E.C. Bonefeld-Jørgensen. "Effects of Phthalates on the Human Corneal Endothelial Cell Line B4G12" International journal of toxicology, vol. 31, no. 4, pp. 364–371, 2012.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS (DERIVADOS DEL ÁCIDO FTÁLICO).

Balderas-Hernández, V.E., Zermeño-Pérez, D., y De-León-Rodríguez, A.

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a la Presa San José 2055. Col Lomas 4A Secc. San Luis Potosí, S.L.P. CP 78216

*Autor para correspondencia: victor.balderas@ipicyt.edu.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

Los plastificantes, en especial los ftalatos (derivados del ácido ftálico), son usados para la fabricación de una amplia gama productos textiles, alimenticios, médico, de construcción, entre otros. Sin embargo, los ftalatos son capaces de mimetizar hormonas, catalogándose como disruptores endócrinos, afectando el desarrollo embrionario, provocando daño hepático y esterilidad en hombres adultos y niños [1]. Además, la degradación de los ftalatos en el ambiente es un proceso poco eficiente que puede llevar años, haciéndolos contaminantes prioritarios de alta toxicidad [2]. Con ello el objetivo del presente trabajo fue el identificar y caracterizar aislados bacterianos procedentes de zonas contaminadas con metales pesados y salinidad de los estados de San Luis Potosí y Zacatecas, con la finalidad de caracterizar su capacidad para la degradación de ftalatos en medio líquido. Se realizó un escrutinio utilizando 30 aislados bacterianos para determinar su tolerancia a concentraciones tóxicas de dietil ftalato (DEP), dibutil ftalato (DBP) y di-2-etil-hexil ftalato (DEHP). Se seleccionaron tres aislados tolerantes a concentraciones de 1000 mg/L de los ftalatos evaluados, los cuales se identificaron filogenéticamente (secuenciación del gen 16S del rRNA) como bacterias de los géneros *Staphylococcus* (MS50-12A), *Brevibacterium* (MR50-9B) y *Pantoea* (I-6B). Se realizaron cinéticas de degradación de los contaminantes, obteniéndose que después de 72 h de cultivo el aislado I-6B logró remover DEP en un 99%, mientras que el aislado MR50-9B obtuvo un 99% de remoción de DBP y DEHP, y finalmente el aislado MS50-12A fue eficiente en remover en un 99% a los tres ftaltos evaluados. El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los sobrenadantes derivados de los cultivos reveló que los ftalatos fueron degradados de forma oxidativa por los microorganismos empleados, de acuerdo con la identificación presuntiva de los intermediarios metabólicos de degradación. Se agradece el apoyo parcial del Proyecto SALUD-2013-01-233340.

Palabras clave: ftalatos, plastificantes, biodegradación, GC-MS, DEP, DBP, DEHP.

REFERENCIAS

[1] S. Benjamin, E. Masai, N. Kamimura, K. Takahashi, RC. Anderson and PA Faisal, "Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action" Journal of Hazardous Materials, vol. 15. no. 340, pp. 360-383, 2017.

[2] A.C. Staple, D.R. Peterson, T.H. Parkerton, and W.J. Adams , "The environmental fate of phthalic esters: A literature review", Chemosphere, 1997, U.S.A.

PROYECTO DE AUTOMATIZACIÓN DE FOTOTERAPIA.

Olvera-Mariscal, A.I. y Soto-Jauregui, P.Y.

*Autor para correspondencia:

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN

El proyecto de automatización de la fototerapia controlada por los rangos del sensor de bilirrubina nos ayuda a generar una terapia mucho más precisa para la ictericia. Las ventajas que nos otorga el dispositivo será que el tratamiento será mucho más preciso, con el objetivo de cuidar la seguridad e integridad del paciente; En comparación a el tratamiento de la fototerapia que actualmente es controlada por los parámetros de tiempo e intensidad sin ninguna relación directa en base a el cálculo del tratamiento con la medición de la bilirrubina al neonato , nuestro dispositivo evitara el exceso en el tiempo de tratamiento ya que generara un parámetro mucho más preciso al estar constantemente muestreando las mediciones de la bilirrubina del neonato teniendo como ventaja que en base a este parámetro podemos regular la intensidad del foco cuidando la eficiencia del tratamiento en el paciente además de generar un dispositivo mucho más preciso . El control de la bilirrubina se hará por medio de un algoritmo dentro de un microprocesador que determinara las diferentes intensidades de la fototerapia y con parámetros previamente establecidos se determinaran los tiempos finales de fototerapia para los neonatos obteniendo una fototerapia segura y confiable.

Palabras clave:

REFERENCIAS

BIOCHECK.

Jiménez-Mancilla, C. N., Oros-Zamora, E. F. y Olivos-Mondragón, A. A.

*Autor para correspondencia: claudia.mancilla@edu.uag.mx.

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN
La intensión de nuestro proyecto es ayudar a disminuir las posibilidades de tener diabetes o de que esta se convierta en DT2. Esto se busca lograr con una interfaz de aplicaciones en la cual el paciente pueda interactuar con su médico de elección. El paciente usará un módulo capaz de medir los niveles de azúcar, el cual será conectado a un smartphone con el fin de poder crear un historial de las mediciones del paciente. Por otro lado, el medico tendrá una segunda app en la cual podrá revisar los datos enviados por sus pacientes, también podrá mandar mensajes de voz o texto a ellos para dar nuevas indicaciones o para generar alguna cita. Con esto los médicos podrán tener una ganancia monetaria basada en el tipo de interacción que hagan con sus pacientes, con el fin de poder retribuir su conocimiento y esfuerzo.

Palabras clave:

CPR MODE AUTOMATIZATION FOR AN INTENSIVE CARE UNIT.

Mondragón-Olivos, A.A. y Zerecero-Núñez, J.A.

*Autor para correspondencia:

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica.

RESUMEN
Intensive care units are used in areas where delicate patients need to be looked out for. For this reason, this units must include different modes to position the patient for which the bed must be moved manually. In addition, this beds include a CPR mode in which the bed is lowered and placed parallel to the ground, in order to apply CPR to the patient if ever needed. This CPR mode must always be manually enabled by pressing a button or removing some locks. The nurse must wait for the bed to get into position before applying CPR, which is a waste of valuable time. So, our proposal consists on implementing an automatic CPR mode system which constantly monitors the patient's pulse, and whenever it stops detecting the pulse, the bed itself will move into CPR mode and emit an alarm. This way, the bed will be ready for action for when the nurses come to aid the patient. This time saving could save lives.

Palabras clave:

Capítulos temáticos de Biología, Química y Agronomía.

Ciencia e innovación para la salud.

Se realizó en el Departamento de Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Composición, diseño y proceso editorial a cargo de José Luis Zavala Aguirre. Diseño de la cubierta a cargo de la Dirección de Comunicación Universitaria, Universidad Autónoma de Guadalajara.

Se terminó de editar en diciembre de 2017 en las instalaciones de la Editorial Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Lomas del Valle 45129, Zapopan, Jalisco, México